



Etude physiopathologique de modèles murins de leucodystrophies dysmyélinisantes et approche thérapeutique

Bérengère Depiets

► To cite this version:

Bérengère Depiets. Etude physiopathologique de modèles murins de leucodystrophies dysmyélinisantes et approche thérapeutique. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2012. Français. NNT : 2012CLF1MM04 . tel-01077895

HAL Id: tel-01077895

<https://theses.hal.science/tel-01077895>

Submitted on 27 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

UNIVERSITE D'Auvergne

ANNEE 2012

**ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

N° d'ordre : 04-DOC

THESE

Présentée à L'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université
Spécialité Génétique et Physiologie

Soutenue publiquement le vendredi 8 juin 2012

Bérengère DEPIETS

**ETUDE PHYSIOPATHOLOGIQUE DE MODELES MURINS DE
LEUCODYSTROPHIES DYSMYELINISANTES
ET APPROCHE THERAPEUTIQUE**

Président : - Pr. Alain ESCHALIER

Rapporteurs : - Dr. Nathalie MANDAIRON
- Dr. Brahim NAIT-OUESMAR
- Pr. Cyril GOIZET

Membres : - Dr. Mélina BEGOU

Directrice de thèse : - Pr. Odile BOESPFLUG-TANGUY

INSERM UMR 676

« Physiopathologie et thérapies des maladies du cerveau de l'enfant »
Equipe « interaction des cellules gliales au cours du développement normal
Et pathologique du système nerveux central »

Laboratoire d'accueil

UMR 676, « Physiopathologie et thérapies des maladies du cerveau de l'enfant »

Directeur : **Pierre GRESSENS**

Hôpital Robert Debré

48, boulevard Sérurier

75019 Paris

Membres du jury

Pr. Alain ESCHALIER, PU-PH

Neuro-Dol, INSERM U1107

Laboratoire de Pharmacologie Médicale

Faculté de Médecine / Pharmacie

28 place Henri-Dunant, BP 38

63001 Clermont-Ferrand Cedex 1

Dr. Nathalie MANDAIRON, Ph.D, Chercheur CNRS CR2

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon,

UMR 5292 INSERM 1028, Université Lyon1,

50 avenue Tony Garnier,

69366 Lyon Cedex 07

Dr. Brahim NAIT-OUESMAR, Ph.D, Chercheur INSERM CR1

Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière - CRICM

Université Pierre et Marie Curie - Paris 6/INSERM UMR-S975, CNRS UMR 7225

47 bd de l'Hôpital

75651 Paris cedex 13

Pr. Cyril GOIZET, PU-PH

EA4576, Laboratoire MRGM « Maladies Rares : Génétique et Métabolisme »

Université Bordeaux Segalen

UFR des Sciences médicales

146 rue Léo Saignat, Case 16

33076 Bordeaux Cedex

Pr. Odile BOESPFLUG-TANGUY, PU-PH

Centre de référence des Leucodystrophies

Service de « Neurologie Pédiatrique

et Maladies Métaboliques »

Hôpital Robert Debré

48 boulevard Sérurier

75935 Paris cedex 19

INSERM UMR 676 « Physiopathologie et thérapies
des maladies du cerveau de l'enfant »

Equipe « Interaction des cellules gliales au cours du
développement normal et pathologique du système
nerveux central »

Dr. Mélina BEGOU, Pharm.D, Ph.D

INSERM UMR 676 « Physiopathologie et thérapies des maladies du cerveau de l'enfant »

Equipe « Interaction des cellules gliales au cours du développement normal et pathologique du
système nerveux central »

Faculté de Médecine / Pharmacie

28 place Henri Dunant, BP 38

63001 Clermont-Ferrand cedex 1

Remerciements

Je voudrais tout d'abord exprimer ma grande reconnaissance au Docteur Nathalie Mandairon, ainsi qu'au Docteur Brahim Nait-Oumesmar et au Professeur Cyril Goizet pour avoir gentiment accepté d'endosser le rôle de rapporteurs de cette thèse et pris sur leur temps précieux pour juger mes travaux. Je remercie vivement le Professeur Alain Eschalié d'avoir bien voulu présider ce jury et participé à la discussion sur ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Caroline Sevin et le Docteur Laurent Bardin pour avoir accepté d'être mes rapporteurs aux deux comités de thèse qui se sont réunis pendant mon doctorat, et d'avoir ainsi suivi l'évolution et participé à la réflexion autour de ce travail. Laurent, c'est un peu à cause, mais surtout grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui. Je te remercie de ton soutien précieux depuis de nombreuses années maintenant et d'avoir été plus que mon maître de stage de M2. J'espère que nous continuerons encore longtemps à rester en contact.

Je remercie sincèrement le Professeur Odile Boespflug-Tanguy pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et encadrée durant ces années de doctorat. Vous avez su me faire partager votre passion pour la recherche sur ces maladies rares que sont les leucodystrophies. Malgré un emploi du temps très chargé et votre récent départ à Paris, vous avez su être disponible pour discuter de mes problèmes scientifiques et me guider dans mes travaux de recherche.

Je tiens à remercier vivement le Docteur Mélina Bégou pour sa confiance, son soutien, ainsi que pour les précieux moments scientifiques qu'elle a pu m'accorder. Tu es la meneuse de notre « team souris », et grâce à ta disponibilité et tes connaissances, tu m'as permis d'appréhender certains domaines de la recherche et une rigueur scientifique indispensable à ce métier. Je te remercie pour ton dynamisme, tes conseils avisés et la bonne humeur dans laquelle ce travail a pu être réalisé, malgré les passages difficiles. Tu as su être le ciment d'une équipe soudée, ce qui nous a permis d'avancer dans les meilleures conditions possibles.

Merci à Céline Béchon (notre « Denise ») qui a grandement participé à l'étude sur ces modèles souris en passant de nombreuses heures à couper, trier, marquer, compter, analyser...et j'en passe ! Merci pour ta précieuse aide technique et ta disponibilité, bien sûr toujours avec ton dynamisme et le sourire. Quel bonheur de travailler avec des personnes telles que toi !

Un grand merci à ma coupine de rédaction, Aurélia. Rassures-toi, je t'airai ton magnifique petit surnom acquis lors de nos déplacements en congrès et qui nous a permis de connaître des instants mémorables à tes dépends, désolée...En tout cas, sans toi la motivation des débuts de rédaction n'aurait pas été la même. Et même si tu m'as « abandonné » un peu trop tôt à mon goût (mais

c'est pour la bonne cause et l'appel de la frite et du chocolat !), je te remercie de ces moments passés en ta compagnie, à rire ou à râler, peu importe, ce n'était que du bonheur d'avoir pu partager ces quelques années avec une collègue telle que toi. Ne changes rien !

Je remercie également tous les autres membres de la « team myéline ». Catherine, Anne, Cathy, Geneviève, Imen, Samia, Céline GG (dite « Gisèle »), Marina, Robert et Fabrice, merci pour votre soutien, votre disponibilité et votre bonne humeur au quotidien qui me permettront de garder des souvenirs du doctorat au-delà du cadre professionnel.

Je tiens finalement à remercier ceux qui occupent une place très importante dans ma vie, ma famille. Tout d'abord, merci infiniment à mon Papa et ma Maman. Même si nous sommes physiquement éloignés, vous avez toujours été là pour moi et pour supporter mon caractère. Vous avez su m'épauler, comme le font les meilleurs parents, depuis le début de cette grande aventure qu'est la thèse, et avez toujours cru en moi, même quand parfois je n'y croyais plus moi-même. Mamounette, tu as toujours été présente et à mon écoute, pendant des soirées entières scotchée au téléphone à me rassurer sur l'avenir et me conseiller dans les choix difficiles d'un parcours professionnel semé d'embûches, merci d'avoir toujours été là pour moi malgré les difficultés. Je vous aime profondément et j'espère que vous serez toujours fiers de moi.

Merci à mes frères, Gérald et Jonathan, qui même s'ils ont toujours aimé taquiner et tourmenter leur « petite » sœur, ont toujours été là pour partager les moments de joie et de peine. J'aimerais que vous soyez fiers de moi comme je suis fière de vous !

Un grand merci à mon Aurélien, pour son soutien indéfectible et son réconfort dans les moments durs. Tu as dû gérer mon stress et mes humeurs au quotidien et il est clair que ce n'est pas un détail ! Tu as admis les sacrifices personnels qui peuvent être faits durant une thèse et je t'en remercie infiniment, car le chemin est encore long mais nous construisons aujourd'hui ce que sera notre avenir. Merci d'avoir ce grain de folie qui m'a souvent permis de mettre les soucis de côté. Tout simplement merci d'être tel que tu es.

Enfin, merci à mes amis, et particulièrement les clermontois dont j'ai fait la connaissance en même temps que ma ville d'adoption. Nos soirées mémorables et les parties de rigolade m'ont été d'un grand soutien moral, et j'espère qu'il y en aura encore de nombreuses à venir !

Etude physiopathologique de modèles murins de leucodystrophies dysmyélinisantes et approche thérapeutique

Résumé

Les mutations du gène des protéolipoprotéines, *PLP1*, codant des protéines structurales majeures de la myéline du système nerveux central : PLP et DM20, sont responsables d'un sous-groupe de leucodystrophies dysmyélinisantes liées à l'X. La forme la plus sévère, la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD), induite principalement par des duplications du gène conduit à une hypomyélinisation majeure ; tandis que la forme la plus modérée, la paraplégie spastique de type 2 (SPG2), induite par des mutations non-sens ou des délétions du gène conduit à une myéline mal compactée et une dégénérescence axonale tardive. Ce travail de thèse porte sur la caractérisation phénotypique de souris transgéniques mâles présentant une invalidation du gène *Plp1* (souris *Plp* null), ainsi que des femelles hétérozygotes pour cette mutation et surexprimant le gène *Plp 1* (souris PLOA), modèles des mères transmettrices de ces maladies. Une étude longitudinale du comportement de ces souris a été réalisée et a permis de mettre en évidence chez les souris mâles *Plp* null l'apparition de troubles moteurs, sensitifs et cognitifs, qui ont pu ensuite être reliés à des anomalies d'expression (1) de marqueurs astrocytaires ou microgliaux et de neuropeptides impliqués dans la douleur au niveau de la moelle épinière, (2) de marqueurs ayant un rôle dans les processus cognitifs dans le cerveau et notamment dans certaines régions de l'hippocampe et (3) à des altérations des vitesses de conduction nerveuse. Chez les femelles mutées *Plp1*, les anomalies comportementales semblent liées au génotype, avec le développement de symptômes uniquement chez les mères porteuses de mutation modérée.

Depuis quelques années, un ensemble de données évoquent un rôle de la substance blanche, et notamment la myéline, dans les fonctions comportementales et cognitives. Les résultats obtenus au cours de ce travail confirment l'intérêt des souris *Plp* null pour mieux comprendre ce rôle. De plus, les nombreuses similarités identifiées entre les modèles animaux et la pathologie humaine permettent d'envisager l'utilisation de ces modèles pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous avons ainsi évalué l'efficacité d'un neuroleptique atypique sur les troubles comportementaux des souris mâles *Plp* null.

Mots-clés : *PLP1*, protéolipoprotéines, leucodystrophies dysmyélinisantes, maladie de Pelizaeus-Merzbacher, paraplégie spastique de type 2, modèles animaux, comportement, étude physiopathologique.

Pathophysiological study of mouse models of dysmyelinating leukodystrophies and therapeutic approach

Abstract

Mutations of the proteolipoprotein gene, *PLP1*, coding the major structural proteins of the central nervous system, PLP and DM20, are responsible of some X-linked dysmyelinating leukodystrophies. The most severe form, the Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD), due to gene duplications, causes a major hypomyelination; while the moderate form, the spastic paraplegia type 2 (SPG2), due to non-sense mutations or gene deletions, leads leading to unpacked myelin and late axonal degeneration. This thesis work focuses on phenotypic characterization of transgenic male mice with *Plp1* invalidation (Plp null mice), together with heterozygous females for this mutation and overexpressing *Plp1* (PLOA mice), models of carrier mothers of these diseases. A longitudinal study on mice behavior was performed and allowed to highlight in Plp null male mice, the onset of motor, sensitive and cognitive defects, then linked to expression abnormalities of (1) astrocytic or microglial markers and neuropeptides involved in painful processes in spinal dorsal horn, (2) markers implied in cognitive processes in brain and especially some hippocampus regions, (3) alterations of nerve conduction velocities. In *Plp1*-mutated females, behavioral abnormalities seem to be related to genotype, with development of symptoms only in females carrying moderate mutation. Since few years, data suggest a role of white matter, and particularly myelin, in cognitive and behavioral functions. Results of this study confirm the interest of Plp null mice to better understand this role. Further, similarities identified between animal models and human pathology, allow to consider these models to assess new therapeutic perspectives. We thus assessed the efficiency of a typical neuroleptic on Plp null mice behavioral alterations.

Key-words

PLP1, proteolipoprotein, dysmyelinating leukodystrophies, Pelizaeus-Merzbacher disease, Spastic paraplegia type 2, animal models, behavior, pathophysiological study.

ABREVIATIONS

5-HT : sérotonine
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate
ASIC : canaux ioniques sensibles à l'acidité
ATP : adénosine triphosphate
ASE : antisilencer/enhancer element
Caspr(2) : contactin-associated protein (2)
CIDN : contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs
CNP : 2',3'-cyclic nucléotide 3'-phosphodiesterase
CGRP : calcitonin gene related peptide
CNTF : facteur neurotrophique ciliaire
CPF : cortex préfrontal
CRF : corticotropin-releasing factor
CXCL1 : chemokine (C-X-C motif) ligand 1
DLT : dépression à long terme
DRG : ganglion des racines dorsales
EAE : encéphalite auto-immune expérimentale
EFG : facteur de croissance épidermique-like
eIF2B : facteur d'initiation de la traduction 2B
ENMG : électro-neuro-myogramme
ERAD : ER- associated degradation
ESE : exonic splicing enhancer
FGF : facteur de croissance fibroblastique (fibroblast growth factor)
FoStES : Fork Stalling and Template Switching
GABA : Gamma-Amino-Butyrique-Acide A
GalC : galactosylceramidase
GDNF : glial derived neurotrophic factor
GFAP : protéine glio-fibrillaire acide (glial fibrillary acid protein)
GGF : facteur de croissance gliale
GM1 : monosialoganglioside
GM4 : sialosylgalactosylcéramide
HCC : Hypomyelination with Congenital Cataract
HDACs : histones déacétylases
HGF : facteur de croissance des hépatocytes
IASP : International Association for the Study of Pain
IB4 : isolectine B4
Iba1 : ionized calcium binding adaptor molecule 1
IGF1 : facteur de croissance à l'insuline 1
IPLs : lignes intrapériodiques
IRM : imagerie par résonance magnétique
ISE : intronic splicing enhancer
LCR : liquide céphalo-rachidien
LCRs : Low-copy repeats
LD : leucodystrophie
LDM : leucodystrophie métachromatique
LIF : facteur inhibiteur leucémique
MAG : myelin-associated glycoprotein
MBP : myelin basic protein
MDLs : lignes denses majeures
ME : moelle épinière
MLC1 : megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1

MOG : myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
 MRF : facteur régulateur du gène de la myéline
 MyT 1-2 : Myelin transcription factor 1-2
 NA : noradrénaline
 NAA : N-acétyl-aspartate
 NGF : nerve growth factor
 NMDA : N-méthyl-D-aspartate
 NRG : neuréguline
 NT3 : neurotrophine 3
 OL(s) : oligodendrocyte(s)
 OPCs : précurseurs des OLs (oligodendrocyte precursor cells)
 PA: potentiel d'action
 PCWH : peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease
 PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes
 PES : potentiel évoqué somesthésique
 PFA : paraformaldéhyde
 PKC γ : protéine-kinase C γ
 PLP : protéolipoprotéines
 PLT : potentialisation à long terme
 PMD : maladie de Pelizaeus-Merzbacher
 PSA-NCAM : molécule d'adhésion cellulaire neuronale polysialylée
 qRT-PCR : RT-PCR quantitative en temps réel
 RBRV : région bulbaire rostroventrale
 RER : réticulum endoplasmique rugueux
 RT-PCR : reverse transcription – Polymerase chain reaction
 SB : substance blanche
 SEP : sclérose en plaques
 SERT : site transporteur de recapture de la 5-HT
 SG : substance grise
 Shh : sonic hedgehog
 SIRT2 : Sirtuine 2
 SNC : système nerveux central
 SNP : système nerveux périphérique
 SPG2 : paraplégie spastique de type 2
 SPGA : substance grise périaqueducule
 T3 : hormone thyroïdienne triiodothyronine
 TACH : Tremor, Ataxia with Central Hypomyelination
 TMEV : Theiler's murine encephalomyelitis virus
 TRP : *canaux ioniques «transient receptor potential»*
 TRPV1 : récepteur ionotrope vanilloïde VR-1
 TTx : tétrodotoxine
 UPR : unfolded protein response
 VCN : vitesse de conduction nerveuse
 YY1 : facteur de transcription Ying Yang 1
 Zfp 191 : protéine à doigts de zinc 191

SOMMAIRE

INTRODUCTION	17
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
I. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	21
A. DESCRIPTION ANATOMIQUE DU SNC	21
1. <i>L'encéphale</i>	22
2. <i>La moelle épinière</i>	23
3. <i>Les nerfs crâniens</i>	25
B. COMPARTIMENTATION DU SNC	26
1. <i>La substance grise et les neurones</i>	26
2. <i>La substance blanche</i>	28
a. Les axones	28
b. Les cellules gliales.....	30
(1) Les épendymocytes.....	31
(2) Les cellules de la microglie	31
(3) Les astrocytes.....	35
(4) Les oligodendrocytes	37
(4.a) Définition.....	37
(4.b) Mécanismes de maturation des OLs.....	37
(4.c) Mécanismes de mort des OLs	41
C. FONCTIONS DU SNC.....	42
1. <i>La fonction motrice</i>	42
2. <i>La fonction sensorielle</i>	42
a. Les sens spécifiques	42
b. La somesthésie : le cas particulier de la douleur	44
(1) Mécanismes périphériques impliqués dans la douleur	44
(1.a) Les fibres nociceptives	45
(1.b) Les récepteurs élémentaires.....	46
(1.c) Les canaux voltage-dépendants	49
(2) Mécanismes spinaux impliqués dans la douleur : Les voies ascendantes.....	49
(2.a) Neurones spinaux impliqués dans la douleur	49
(2.b) Les faisceaux spinaux	50
(3) Mécanismes centraux impliqués dans la douleur.....	51
(4) Mécanismes de contrôle de la douleur.....	53
(5) Les syndromes douloureux	56
(5.a) La douleur « physiologique »	56
(5.b) La douleur « inflammatoire »	57
(5.c) La douleur « neuropathique ».....	57
(6) Implication des cellules gliales dans la douleur	59
(7) Explorations fonctionnelles.....	61
3. <i>La fonction cognitive</i>	62
a. La mémoire.....	62
(1) Les différents types de mémoire	62
(1.a) La mémoire sensorielle	63
(1.b) La mémoire à court terme	63

(1.c) La mémoire à long terme	63
(2) Processus d'acquisition et de restitution	65
(3) Les structures cérébrales impliquées ou systèmes de mémoire	66
(3.a) Le cas particulier du patient HM	66
(3.b) Le circuit hippocampique	67
(3.c) Le circuit amygdalien	70
(3.d) Implication du striatum et des ganglions de la base	70
(3.e) Implication corticale	73
(3.f) En résumé	74
(4) Mécanismes cellulaires de la mémorisation	75
(5) Bases moléculaires de la mémoire	77
b. L'anxiété	78
(1) Structures cérébrales et circuits de l'anxiété	79
(2) Bases moléculaires de l'anxiété	81
(2.a) Le glutamate et le GABA	81
(2.b) Les monoamines	83
(2.c) Les neuropeptides	85
II. LA MYÉLINE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET SA PATHOLOGIE.....	87
A. DEFINITION	87
B. ORGANISATION DE LA MYELINE	88
1. <i>Les internodes.....</i>	89
2. <i>Les paranodes et juxtaparanodes</i>	90
3. <i>Les nœuds de Ranvier.....</i>	92
C. COMPOSITION DE LA MYELINE DU SNC.....	93
1. <i>Les lipides de la myéline</i>	93
2. <i>Les protéines de la myéline</i>	94
3. <i>Assemblage intracellulaire de la myéline et intégration membranaire.....</i>	95
D. FORMATION DE LA MYELINE AU COURS DU DEVELOPPEMENT	96
E. ROLE DE LA MYELINE.....	97
1. <i>Conduction de l'influx nerveux</i>	97
2. <i>Protection de l'axone et interactions cellulaires</i>	98
F. PATHOLOGIES NEUROLOGIQUES ET ANOMALIES DE LA SUBSTANCE BLANCHE.....	99
1. <i>Pathologies avec atteinte primitive de la substance blanche</i>	99
a. Pathologies génétiques : les leucodystrophies	99
(1) Les leucodystrophies hypomyélinisantes	101
(2) Les leucodystrophies démyélinisantes	102
b. Pathologie acquise : le cas de la sclérose en plaques	103
(1) Sclérose en plaques et douleur	104
(2) Sclérose en plaques et cognition	104
2. <i>Pathologies neurodégénératives impliquant une atteinte de la substance blanche</i>	105
a. La schizophrénie	105
b. La maladie d'Alzheimer	108
c. La maladie de Parkinson.....	108
d. Conclusion	109

III. LE GÈNE DES PROTÉOLIPOPROTÉINES (PLP1) ET SES IMPLICATIONS FONCTIONNELLES	111
A. FAMILLE PHYLOGENIQUE DES PROTEOLIPOPROTEINES	111
B. STRUCTURE DU GENE PLP1	111
C. PRODUITS D'EXPRESSION DU GENE PLP1	113
1. <i>Structure et synthèse de PLP/DM20.....</i>	113
2. <i>Distribution spatiale de l'expression des protéolipoprotéines</i>	113
3. <i>Expression des protéolipoprotéines au cours du développement.....</i>	114
4. <i>Régulation de l'expression de PLP/DM20</i>	114
D. FONCTIONS BIOLOGIQUES DE PLP/DM20	115
E. PATHOLOGIES LIEES AU GENE PLP1	117
1. <i>Pathologies affectant l'homme : les PLP-pathies.....</i>	117
a. <i>La maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD)</i>	118
b. <i>La paraplégie spastique de type 2 (SPG2)</i>	122
2. <i>Les PLP-pathies des femmes hétérozygotes.....</i>	123
3. <i>Les modèles animaux</i>	127
a. <i>Les mutants naturels</i>	127
(1) <i>Les souris mutants naturels</i>	127
(2) <i>Les rats mutants naturels.....</i>	132
(3) <i>Les mutants naturels d'autres espèces.....</i>	133
b. <i>Les modèles murins transgéniques.....</i>	133
(1) <i>Les souris et les rats sur-exprimant Plp1 (ou PLOA)</i>	133
(2) <i>Les souris avec inactivation du gène Plp1 (ou Plp null)</i>	137
(3) <i>Les souris exprimant DM20 seul</i>	139
(4) <i>Les souris exprimant un ratio modifié de PLP/DM20</i>	139
c. <i>Les modèles de mères hétérozygotes transmettrices de Plp-pathies.....</i>	140
OBJECTIFS.....	145
TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	151
Article 1. "Mechanism of hypersensitivity to thermal stimuli in mice with deletion of the major myelin protein"	151
I. <i>Présentation et méthodologie</i>	151
II. <i>Résultats et discussion</i>	152
III. <i>Conclusion et perspectives.....</i>	155
IV. <i>Article</i>	156
Article 2. "Motor but also cognitive defects in mice deleted for the major myelin protein"	159
I. <i>Présentation et méthodologie</i>	159
II. <i>Résultats et discussion</i>	160
III. <i>Conclusion et perspectives.....</i>	162
IV. <i>Article</i>	162

Article 3. “Effect of a neuroleptic treatment on abnormal behavior induced by lack of PLP1, the major myelin protein of central nervous system”	165
I. Présentation et méthodologie	165
II. Résultats et discussion	166
III. Conclusion et perspectives.....	169
IV. Article	170
 Article 4. “Cognitive and sensitive abnormalities in heterozygous female mice lacking PLP, the major myelin protein of central nervous system”	173
I. Présentation et méthodologie	173
II. Résultats et discussion	173
III. Conclusion et perspectives.....	176
IV. Article	176
 CONCLUSION GÉNÉRALE	179
 Références bibliographiques	193
 Annexes.....	213

LISTE DES TABLEAUX

TABEAU 1. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS TYPES DE MEMOIRE.	63
TABEAU 2. TABLEAU RECAPITULATIF DES PATHOLOGIES INCLUSES DANS LES DEUX GRANDES CATEGORIES DE LEUCODYSTROPHIES.	100

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. COMPOSANTS ANATOMIQUES MAJEURS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL.	21
FIGURE 2. COMPARAISON DE L'ANATOMIE CEREbraLE DE L'HOMME ET DE LA SOURIS.	24
FIGURE 3. COUPE TRANSVERSALE DE MOELLE EPINIERE.....	24
FIGURE 4. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS NERFS CRANIENS.	25
FIGURE 5. STRUCTURE D'UN NEURONE.	27
FIGURE 6. LES CATEGORIES DE NEURONES SELON DES CRITERES FONCTIONNELS ET MORPHOLOGIQUES.	27
FIGURE 7. RESUME DES FONCTIONS AXONALES.	29
FIGURE 8. ILLUSTRATION DES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES GLIALES.	30
FIGURE 9. LES DIFFERENTS ETATS D'ACTIVATION DE LA MICROGLIE.....	34
FIGURE 10. SCHEMATISATION DE LA SYNAPSE TRIPARTITE.....	36
FIGURE 11. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA LIGNEE OLIGODENDROCYTAIRE.....	39
FIGURE 12. SCHEMATISATION DES MULTIPLES MECANISMES INFLUENÇANT LA DIFFERENCIATION ET LE DEVELOPPEMENT DES OLIGODENDROCYTES (OLs) A DIVERS STADES DEVELOPPEMENTAUX.	40
FIGURE 13. LES TROIS GRANDES CATEGORIES DE FIBRES NERVEUSES.....	45
FIGURE 14. ZONES DE PROJECTION DES DIFFERENTES CATEGORIES DE FIBRES NOCICEPTIVES AU NIVEAU DE LA CORNE DORSALE DE LA MOELLE EPINIERE.	47
FIGURE 15. DISTRIBUTION DES FIBRES PERIPHERIQUES DANS LES NERFS CUTANES EN FONCTION DU DIAMETRE ET DE LA VITESSE DE CONDUCTION.....	47
FIGURE 16. CANAUX IONIQUES, EXPRIMES DANS LES NEURONES SENSORIELS, POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS LES MECANISMES DE NOCICEPTION.	48
FIGURE 17. VOIES SOMESTHESIQUES ASCENDANTES.	52
FIGURE 18. SCHEMA REVISE DE LA « THEORIE DU PORTILLON ».	55
FIGURE 19. BOUCLE DE RETROACTION NEGATIVE SPINOBLBOSPINALE SOUS-TENDANT UN SYSTEME ANALGESIQUE ENDOGENE MIS EN JEU PAR DES STIMULATIONS NOCICEPTIVES.....	55
FIGURE 20. INTERCONNEXIONS DES STRUCTURES LIMBIQUES CONSTITUANT LE CIRCUIT DE PAPEZ.	68
FIGURE 21. ANATOMIE DU SYSTEME DE MEMOIRE HIPPOCAMPIQUE CHEZ LE PRIMATE ET LE RONGEUR.	69
FIGURE 22. PRINCIPALE CONNEXIONS DE L'AMYGDALE.....	70
FIGURE 23. ANATOMIE DES GANGLIONS DE LA BASE.	71

FIGURE 24. APPRENTISSAGE PAR STRATEGIE « DE PLACE » VS « DE REPONSE ».....	72
FIGURE 25. INTERCONNEXIONS ENTRE LE CORTEX FRONTAL ET LE LOBE TEMPORAL.....	74
FIGURE 26. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES STRUCTURES IMPLIQUEES DANS LES DIFFERENTS TYPES DE MEMOIRE.....	75
FIGURE 27. MECANISME CELLULAIRE DE LA POTENTIALISATION A LONG TERME.	76
FIGURE 28. PRINCIPALES STRUCTURES CEREBRALES IMPLIQUEES DANS LES CIRCUITS DE L'ANXIETE.....	82
FIGURE 29. LES CIRCUITS DE L'ANXIETE. INTERCONNEXION ENTRE LES DIFFERENTES STRUCTURES CEREBRALES IMPLIQUEES DANS LE TRAITEMENT DE L'INFORMATION DES STIMULI EXTERIEURS ET DE LA REPONSE APPROPRIEE.....	82
FIGURE 30. SCHEMATISATION DE L'ENROULEMENT DES PROLONGEMENTS OLIGODENDROCYTAIRES AUTOUR DE L'AXONE POUR FORMER LA GAINE COMPACTE DE MYELINE.	87
FIGURE 31. DESCRIPTION DES DIFFERENTES STRUCTURES DE LA MYELINE.	88
FIGURE 32. STRUCTURE DE LA GAINE DE MYELINE.	90
FIGURE 33. COMPOSITION MOLECULAIRE DES DOMAINES SITUES AU NIVEAU DU NŒUD DE RANVIER.	91
FIGURE 34. ABONDANCE RELATIVE DES PROTEINES DE LA MYELINE.	95
FIGURE 35. STRUCTURE DU GENE <i>PLP1</i> DONNANT LIEU A 2 ISOFORMES PLP ET DM20.....	112
FIGURE 36. STRUCTURE DES ISOFORMES, PLP ET DM20, DANS LA MEMBRANE MYELINIQUE.	112
FIGURE 37. CLASSIFICATION CLINIQUE DES PATHOLOGIES DYSMYELINISANTES LIEES A <i>PLP1</i>	118
FIGURE 39. POSITIONS SUR PLP DES MUTATIONS PRESENTENT CHEZ LES DIFFERENTES SOURIS MUTANTS NATURELS.	128
FIGURE 40. SCHEMATISATION DE LA VOIE DE REPONSE AUX PROTEINES MAL REPLIEES (VOIE UPR).	130
FIGURE 41. SCHEMATISATION DE LA VOIE DE DEGRADATION ASSOCIEE AU RETICULUM ENDOPLASMIQUE (VOIE ERAD).....	131
FIGURE 42. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE SOURIS SUREXPRIMANT LE GENE <i>Plp1</i> (MODELES PLOA #66 ET #72).....	135
FIGURE 43. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE SOURIS INVALIDEE POUR LE GENE <i>Plp1</i> (SOURIS <i>Plp</i> NULL). .	138
FIGURE 44. SCHEMA DU PLAN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE POUR L'EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA RISPERIDONE SUR LES ALTERATIONS COMPORTEMENTALES DES SOURIS <i>Plp</i> NULL.	165
FIGURE 45. DES DYSFONCTIONNEMENTS OLIGODENDROCYTAIRES PEUVENT MENER A DES ALTERATIONS COGNITIVES.	176

LISTE DES ANNEXES

.....

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La myéline est une structure lipoprotéique produite par les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique (SNP) et par les oligodendrocytes (OLs) dans le système nerveux central (SNC). Elle forme autour des axones, une gaine compacte permettant la conduction saltatoire et rapide de l'influx nerveux le long de la fibre. D'autres rôles ont été attribués à la myéline : elle permettrait par sa composition et son organisation, des échanges spécifiques avec l'axone, favorisant ainsi le maintien de l'intégrité axonale. Parmi les pathologies génétiques touchant la substance blanche (SB) du SNC, appelées leucodystrophies, certaines affectent plus primitivement la composition et l'organisation de la myéline.

Les protéolipoprotéines (PLP), codées par le gène *PLP1*, font partie des protéines spécifiques et majeures de la myéline, produites par les OLs. Les mutations du gène *PLP1* induisent chez l'homme un large spectre clinique, allant de pathologies hypomyélinisantes sévères, la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD), à un tableau plus modéré, la paraplégie spastique liée à l'X de type 2 (SPG2), caractérisée par une atteinte axonale tardive prédominante. Des modèles animaux spontanés et transgéniques ont permis ces dernières années de mieux appréhender les rôles de *PLP1*. Ainsi, des modèles murins transgéniques présentant une surexpression du gène *Plp1* (souris PLOA), ou une invalidation du gène *Plp1* (souris *Plp* null) ont été développés afin de modéliser les pathologies humaines.

Afin de mieux appréhender la physiopathologie de ces formes de leucodystrophies, mon travail de thèse a porté sur des analyses comportementales, histologiques et de biologie moléculaire des modèles animaux de SPG2, mais également les modèles des mères hétérozygotes transmettrices de PMD et SPG2.

Etant donné l'intérêt grandissant pour définir le rôle de la SB, et plus particulièrement de la myéline, dans les fonctions cognitives et comportementales, ces modèles animaux peuvent permettre de mieux comprendre ce rôle et d'aborder l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Après une étude bibliographique concernant le SNC, la myéline, le gène *PLP1*, les pathologies induites par les mutations dans ce gène et les rôles potentiels de PLP déduits des observations physiopathologiques, les différents résultats des études sur les modèles animaux seront détaillés et discutés sous forme d'articles, pour essayer de mieux définir les fonctions de PLP.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Le système nerveux est formé de deux parties, le *système nerveux central (SNC)*, dont le rôle est de recevoir, enregistrer, interpréter les signaux qui parviennent de la périphérie, et d'organiser la réponse à envoyer, et le *système nerveux périphérique (SNP)*, constitué par les nerfs crâniens et les nerfs spinaux qui sont rattachés au SNC. Le rôle du SNP est de conduire jusqu'au SNC les informations issues des récepteurs périphériques de la sensibilité ou de la douleur, et de transmettre les ordres moteurs émis par les centres nerveux.

A. Description anatomique du SNC

Le SNC est la partie du système nerveux située dans la boîte crânienne (*encéphale*) et la colonne vertébrale (*moelle épinière, ME*) et comprend également les nerfs crâniens I (nerf olfactif) et II (nerf optique). Il se compose de tissu nerveux, glial et vasculaire, et est entouré par un ensemble de membranes appelées *méninges*.

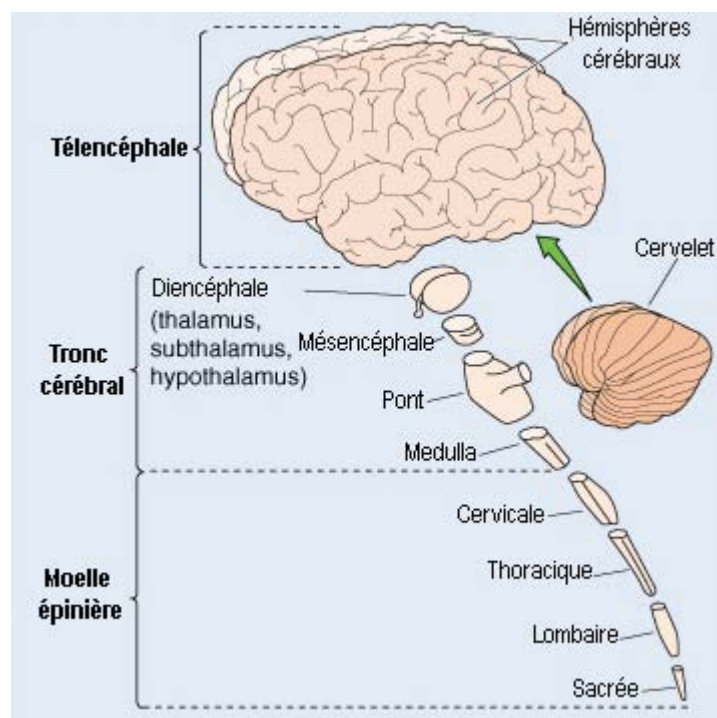


Figure 1. Composants anatomiques majeurs du système nerveux central.

Le système nerveux central se divise en trois grands domaines, le télencéphale, le tronc cérébral et la moelle épinière. D'après Elsevier Ltd. Boron & Boulpaep : Medical Physiology, Updated Edition.

1. L'encéphale

L'encéphale situé dans la boîte crânienne est constitué de 3 éléments (**Figure 1**) :

- *Le cerveau* (ou prosencéphale) qui est constitué par deux hémisphères (droit et gauche), séparés par le sillon inter-hémisphérique et réunis par des structures assurant une connexion entre ces deux hémisphères : le corps calleux et les commissures. Il comprend deux principales structures, le *télencéphale* et le *diencephale*, ce dernier se compose : du *thalamus*, gros noyau gris qui joue un rôle de réception et d'analyse des informations avant de les transmettre à la périphérie du cerveau (cortex cérébral), de l'*hypothalamus* qui joue un rôle de sécrétion des hormones et de régulation du système nerveux végétatif et qui est relié à l'hypophyse par une tige pituitaire, et de l'*hypophyse*, une glande qui régule les autres glandes de l'organisme.

Chez l'Homme, la surface du cerveau présente des sillons plus ou moins profonds, dont certains portent le nom de *scissures* (les scissures de Sylvius et de Rolando sont les deux principales) et permettent de diviser le cerveau en quatre grands lobes : le *lobe frontal* à l'avant, le *lobe pariétal* et le *lobe temporal* au centre et enfin le *lobe occipital* à l'arrière. Chaque lobe est traversé par trois ou quatre sillons qui vont délimiter des circonvolutions.

Il est à noter que, chez la souris, les structures cérébrales sont moins bien délimitées en lobes mais restent bien conservées même si elles apparaissent dans des proportions différentes, par exemple la souris possède un bulbe olfactif très développé en comparaison de celui de l'Homme (**Figure 2**).

- *Le tronc cérébral* est la structure centrale de l'encéphale située au niveau de la fosse postérieure entre le cerveau et la ME. Son architecture repose sur 3 niveaux, de haut en bas, le *mésencéphale*, le *pont* ou *protubérance* et le *bulbe rachidien*. Le tronc cérébral est d'abord la voie de passage des grandes voies ascendantes (voies sensibles et cérébelleuses) et descendantes (voies motrices) véhiculant les informations et transmettant les messages provenant du cortex. Il a également une implication dans le contrôle de l'activité cardiaque et pulmonaire, mais aussi dans la régulation des mécanismes d'éveil et de sommeil.

- *Le cervelet*, chez l'Homme, situé sous le cerveau et en arrière du tronc cérébral et du crâne qui est recouvert par la partie de la boîte crânienne appelée l'*occiput* et par la tente du cervelet, qui sépare le cervelet des hémisphères cérébraux situés immédiatement au-dessus de lui. Il est relié au tronc cérébral par trois paires de pédoncules cérébelleux, supérieurs, moyens, et inférieurs. Par ces pédoncules, vont passer toutes les efférences et afférences provenant de la moelle, du tronc cérébral, des voies vestibulaires et des noyaux des nerfs

crâniens. Le rôle du cervelet porte sur la régulation du tonus et la coordination des mouvements.

L'encéphale contient tous les centres de commande et coordination de la motricité. Il est le centre récepteur de toutes les informations sensorielles. Sa vascularisation est assurée par les troncs artériels cervicaux (artères carotides et artères vertébrales), et les troncs veineux cervicaux (veines jugulaires, plexus veineux cervicaux profonds).

2. La moelle épinière

La ME se situe dans le prolongement du tronc cérébral et du bulbe rachidien. Elle commence immédiatement en dessous du trou occipital. Elle s'intègre en totalité dans le canal rachidien mais se termine, chez l'Homme, au niveau de la première vertèbre lombaire (L1). A partir de la moelle et de chaque espace intervertébral sortent les nerfs spinaux constitués d'une racine antérieure motrice, et d'une racine postérieure sensitive (**Figure 3**). En dessous de L1 et jusqu'au sacrum, le canal rachidien est occupé par les racines des nerfs spinaux issues de la moelle lombaire; l'ensemble de ces racines, qui se mélangent et se confondent, forme ce que l'on appelle communément " la queue-de-cheval".

Sur toute sa longueur, la moelle a une structure homogène. Elle est formée d'un axe de *substance grise* (SG) qui a la forme d'une aile de papillon entouré de *substance blanche* (SB). La SG est formée par les corps cellulaires des neurones, et la SB par le passage des grandes voies motrices, sensibles, cérébelleuses, et extrapyramidales. La voie motrice (ou voie pyramidale) est constituée d'un faisceau descendant direct et un faisceau croisé (il vient du cerveau du côté opposé). Il existe deux voies sensibles : (1) *une voie ascendante directe de la sensibilité proprioceptive profonde* (sens des positions, sensibilité vibratoire) et de la sensibilité superficielle tactile épicrotique (sens du toucher) et qui est située au niveau des cordons postérieurs de la moelle, (2) *une voie ascendante de la sensibilité douloureuse et thermique* qui traverse le centre de la moelle avant de parcourir les faisceaux ascendants latéraux de la moelle.

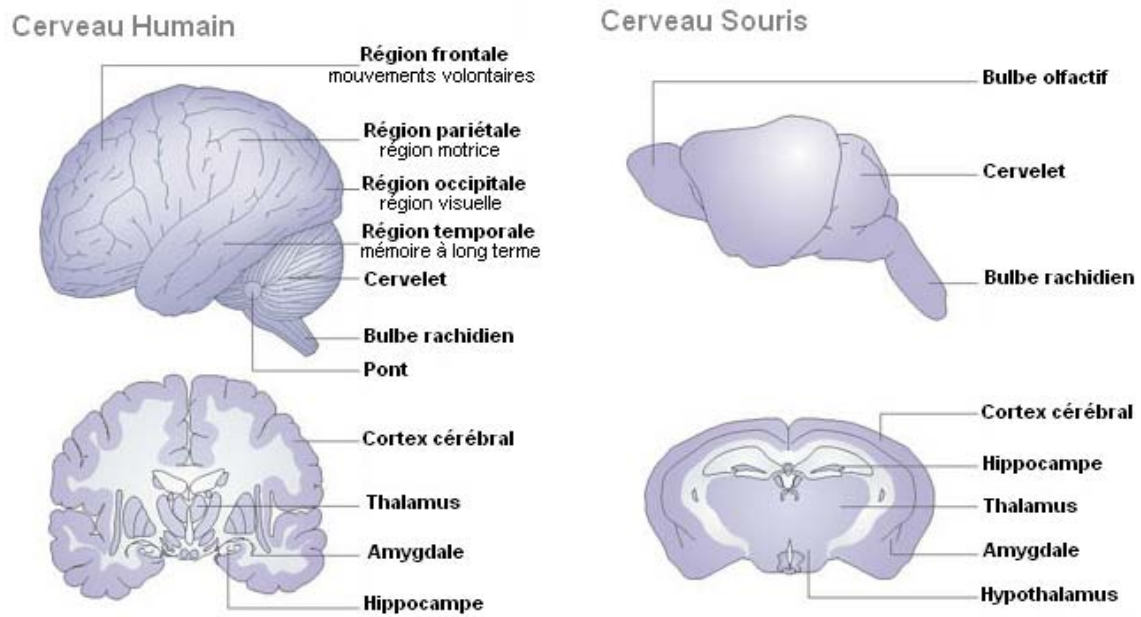


Figure 2. Comparaison de l'anatomie cérébrale de l'Homme et de la souris.

Dans le cerveau humain, même s'ils coopèrent tous ensemble, on peut attribuer à chaque lobe une fonction importante comme les mouvements volontaires, la motricité, la mémoire ou la fonction visuelle. Le cerveau murin est quant à lui dépourvu de lobes mais les structures cérébrales sont bien conservées entre l'Homme et la souris. (D'après, Cryan and Holmes, 2005)

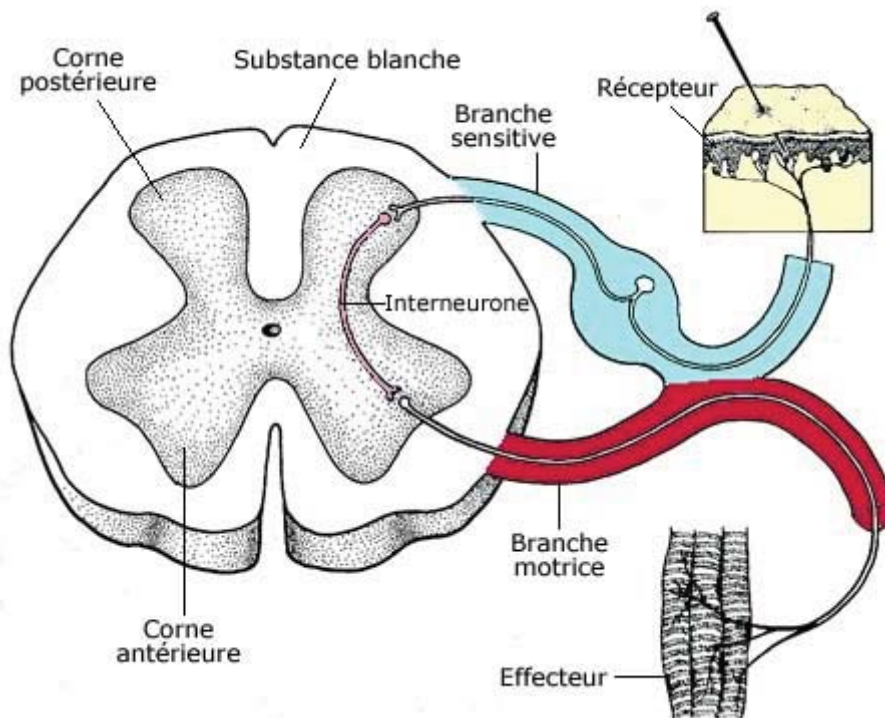


Figure 3. Coupe transversale de moelle épinière.

La moelle épinière se compose de deux structures, la substance blanche formée par le passage des grandes voies motrices, sensibles, cérébelleuses, et extra-pyramidales, et la substance grise formée par les corps cellulaires de neurones. D'après *Anatomie et physiologie humaines*. Elaine N. Marieb, Pearson Education.

3. Les nerfs crâniens

L'Homme possède 12 paires de *nerfs périphériques* dont les deux premiers prennent leur origine dans le cerveau et les autres dans le tronc cérébral (**Figure 4**). On les appelle aussi les *nerfs crâniens*, car ils émergent directement de l'encéphale contrairement à tous les autres nerfs qui émergent de la ME. Ces nerfs sont classés de I à XII : Trois sont de *type sensoriel* (les nerfs olfactif [I], optique [II] et auditif [VIII], appelé aussi vestibulo-cochléaire), cinq sont de *type moteur* (les nerfs oculomoteur [III], trochléaire [IV], moteur oculaire externe ou abducens [VI], spinal [XI] et grand hypoglosse [XII]) et quatre ont à la fois une fonction sensorielle et motrice, et sont dits *mixtes* (les nerfs trijumeau [V], facial [VII], glosso-pharyngien [IX] et pneumogastrique [X], appelé également nerf vague). Le rôle des nerfs crâniens est d'assurer nos cinq sens, les mouvements du visage, la déglutition, et la phonation.

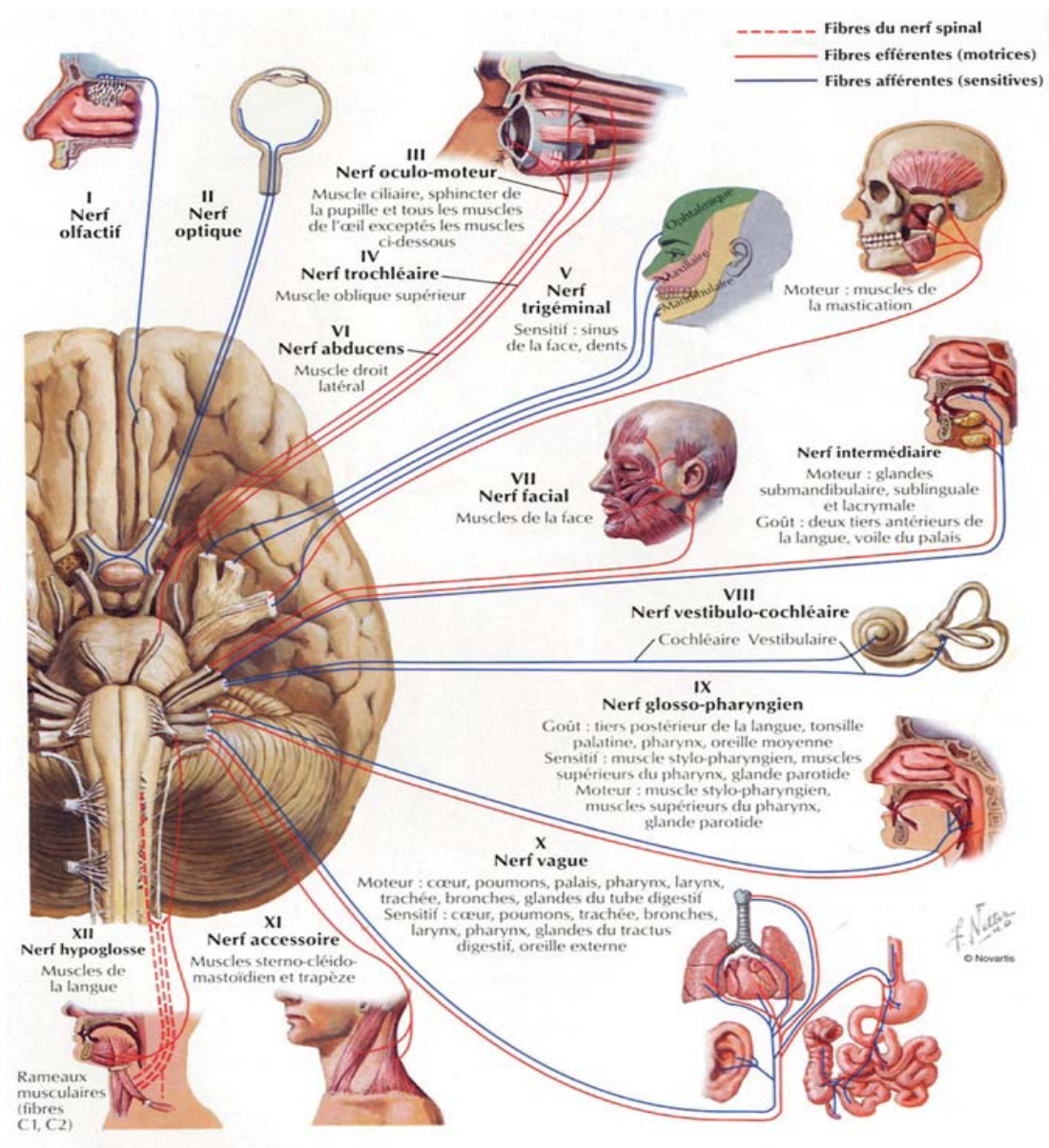


Figure 4. Représentation schématique des différents nerfs crâniens.

B. Compartimentation du SNC

1. La substance grise et les neurones

La SG contient essentiellement les corps cellulaires des neurones, les prolongements dendritiques des neurones et les connexions inter-neurales ou synapses (**Figure 5**). Les neurones, cellules hautement spécialisées et excitables, participent à l'échange d'informations. Cette information est transmise à travers le neurone sous la forme d'un influx nerveux constitué par une succession de potentiels de membrane dépolarisants ou *potentiels d'action* (PA), et au niveau des synapses par la libération dans la fente synaptique de neurotransmetteurs spécifiques du type neuronal. L'influx nerveux est transmis de façon centripète depuis la synapse par les dendrites jusqu'aux corps cellulaires neuronaux qui vont engendrer, en réponse à cet influx, une nouvelle information sous forme d'un potentiel de membrane. Le neurone contient, pour son bon fonctionnement, un cytoplasme riche en organelles et en molécules diverses dont la répartition est spécifique et non homogène.

Chaque neurone est unique de par sa forme particulière, la position qu'il occupe dans le système nerveux et les connexions qu'il entretient avec d'autres neurones ou avec des cellules réceptrices (sensorielles) ou effectrices (musculaires ou glandulaires).

Les corps cellulaires peuvent montrer une grande variabilité de forme (étoilés, fusiforme, conique, polyédrique, sphérique, pyramidale) et de taille. La géométrie des dendrites et de l'axone varie aussi énormément selon le rôle du neurone dans le circuit nerveux. Selon des critères fonctionnels et morphologiques, on peut classer les neurones sous différentes catégories (**Figure 6**):

- *des interneurones* (ou neurone bipolaires) qui connectent entre eux différents neurones à l'intérieur du cerveau ou de la ME. Ils ont deux prolongements principaux de longueur similaire.
- *des neurones sensoriels* (ou unipolaires) qui captent les messages des récepteurs sensoriels et les communiquent au système nerveux central. Ils ont un court prolongement qui se subdivise rapidement en deux, l'un faisant office de dendrite, l'autre d'axone.
- *des neurones moteurs* (ou multipolaires) qui conduisent la commande motrice du cortex à la ME ou de la moelle aux muscles. Ils ont de courtes dendrites émanant du corps cellulaire et un long axone.

D'autres types cellulaires, les cellules gliales, sont également présentes dans la SG, ainsi que de nombreux capillaires sanguins.

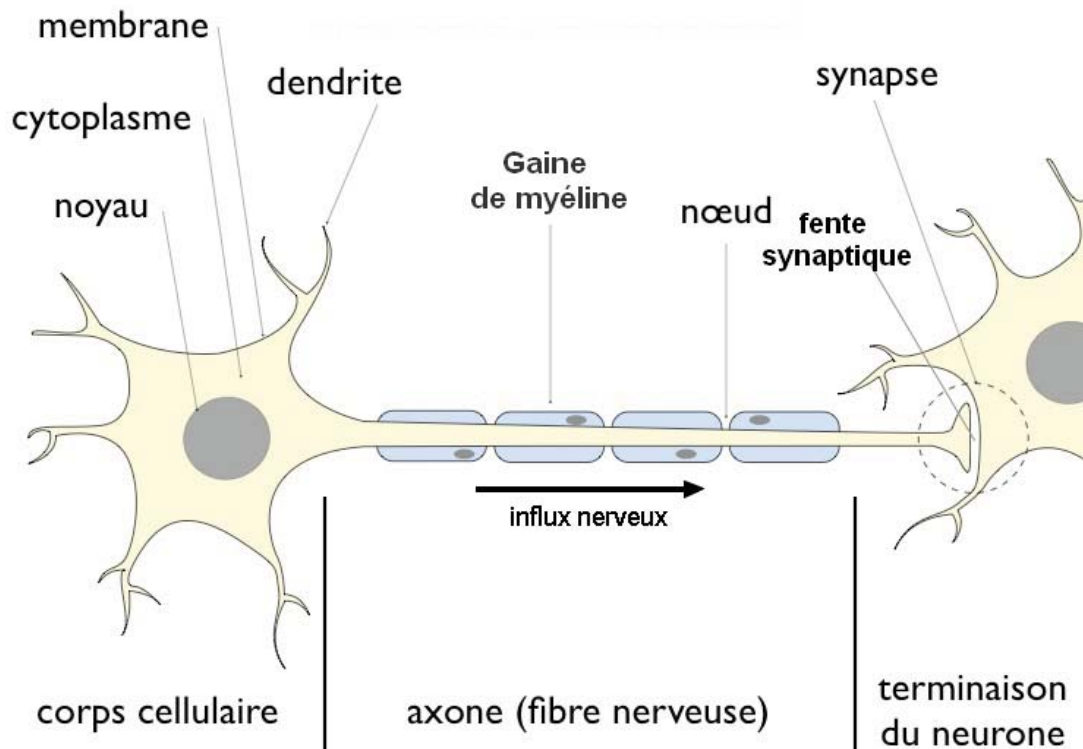


Figure 5. Structure d'un neurone.

Le neurone est constitué d'un corps cellulaire qui contient le noyau et le cytoplasme, et de deux types de prolongements : l'axone, entouré d'une gaine de myéline et conduisant les potentiels d'action de façon saltatoire de nœud en nœud jusqu'à la terminaison où des neurotransmetteurs sont libérés vers la fente synaptique, et les dendrites, prolongements afférents, conduisant l'influx nerveux induit à leur extrémité jusqu'au corps cellulaire.

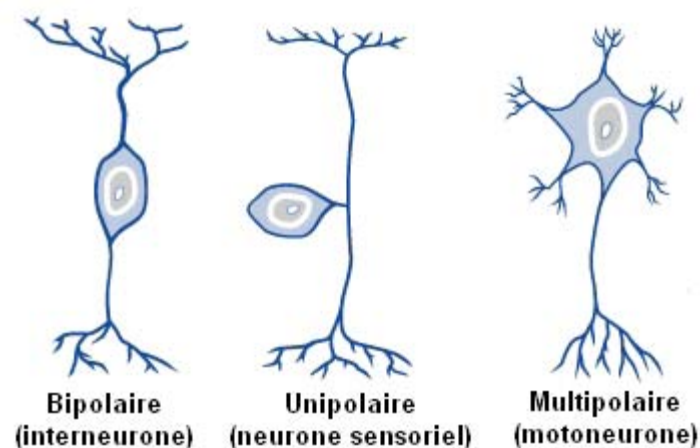


Figure 6. Les catégories de neurones selon des critères fonctionnels et morphologiques.

Les neurones bipolaires établissent les connexions entre neurones, les neurones unipolaires transmettent les messages sensoriels et les neurones multipolaires conduisent la commande motrice.

2. La substance blanche

La SB est un compartiment de conduction qui contient essentiellement des axones myélinisés, correspondant aux prolongements neuronaux, et des cellules gliales, parmi lesquelles on distingue les *épendymocytes*, les *cellules microgliales*, les *astrocytes* et les *oligodendrocytes* (OLs).

a. Les axones

(Pour revue, Debanne et al., 2011)

Les *axones* sont des prolongements cytoplasmiques neuronaux conduisant l'influx nerveux de façon centrifuge du corps cellulaire neuronal jusqu'aux terminaisons nerveuses. Deux types distincts d'axones se situent dans les SNC et SNP: des axones myélinisés et non myélinisés. Les *axones myélinisés* sont recouverts d'une gaine de myéline provenant des cellules de Schwann dans le SNP et des OLs dans le SNC. Ils se composent en 3 compartiments : un segment initial d'où se déclenchent les PA, un axone myélinisé de taille variable qui transmet l'information, et un segment final au-delà duquel les terminaisons synaptiques s'étendent (**Figure 7**). La morphologie des axones, en termes de longueur et diamètre, et la complexité de l'arborisation axonale sont particulièrement variables. L'autre caractéristique morphologique des axones est la présence de nombreux boutons synaptiques qui sont distribués le long des branches fines des axones.

Généralement les axones du SNC sont hautement ramifiés et contactent de nombreux neurones cibles de façon locale ou distante. Mais la fonction de l'axone n'est pas purement limitée à la conduction des PA du site d'initiation près du corps cellulaire aux terminaisons. Des travaux récents ont montrés que des opérations complexes sont spécifiquement exécutées le long de l'axone et qu'il est capable de contrôler la transmission des signaux électriques, en particulier de déterminer l'efficacité et le délai de la transmission synaptique.

Les canaux voltage-dépendants localisés sur la membrane axonale permettent l'initiation et la conduction des PA, et la transmission synaptique, en contrôlant la forme et l'amplitude des pics unitaires et la libération de neurotransmetteurs. Au niveau des axones myélinisés, la conduction saltatoire est rendue possible grâce au regroupement de nombreux canaux sodiques dans le nœud de Ranvier. Dans les axones myélinisés, la vitesse de conduction est dépendante du diamètre des fibres, mais également des interactions neurone-glie. La dépolarisation d'un seul OL augmente de façon importante la vitesse de conduction des PA. La myéline peut ainsi réguler de façon dynamique, la transmission à travers l'axone et favorise la synchronisation entre les différents axones situés dans le domaine d'un seul OL.

Les axones ne contiennent pas seulement des canaux ioniques métabolite- ou voltage-dépendants, mais expriment également une machinerie de libération vésiculaire pré-synaptique et de nombreux récepteurs ligand-dépendants, notamment des *récepteurs GABA_A* (pour Gamma-Amino-Butirique-Acide A) dont l'activation module la conduction des PA, des *récepteurs glutamate* et des *récepteurs purine* qui régulent la libération de transmetteurs au niveau des terminaisons axonales.

Les axones réalisent donc de nombreuses opérations fondamentales qui vont bien plus loin que la propagation classique de l'influx. Ils amplifient et intègrent les signaux électriques et le message produit peut ainsi être dirigé dans des voies axonales sélectives à un régime défini d'activité.

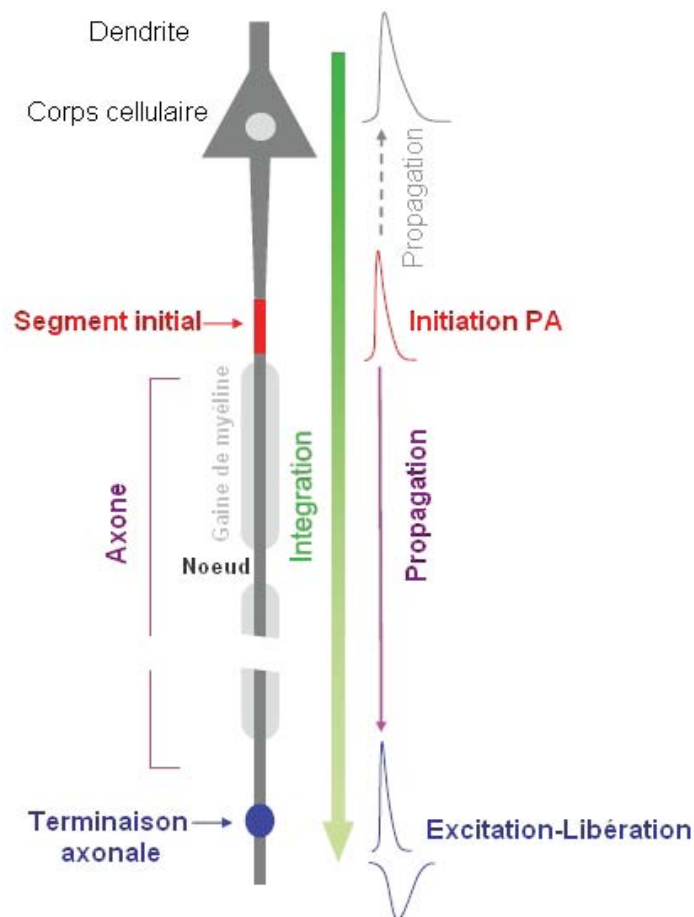


Figure 7. Résumé des fonctions axonales.

Quatre fonctions majeures de l'axone sont illustrées : l'initiation du potentiel d'action (PA), la propagation, l'excitation-libération et l'intégration. Un pic est initié au segment initial de l'axone et se propage jusqu'à la terminaison où les neurotransmetteurs sont libérés. En parallèle, des signaux électriques générés dans le compartiment somato-dendritiques sont intégrés le long de l'axone pour influencer la durée du pic et la libération des neurotransmetteurs (flèche verte). (D'après, Debanne et al., 2011).

b. Les cellules gliales

Dans le SNC, les cellules gliales formant l'environnement des neurones assurent le maintien de l'homéostasie du tissu nerveux et participent au soutien et à la protection du tissu nerveux grâce à l'apport de nutriments et oxygène, l'élimination des cellules mortes, la lutte contre les pathogènes et la production de myéline. On distingue deux catégories de cellules gliales ; les *cellules non myélinisantes* telles que les *épendymocytes* qui bordent les cavités ventriculaires, la *microglie*, sentinelle de la réponse inflammatoire du SNC et les *astrocytes* qui participent à l'homéostasie cérébrale. On trouve également des *cellules myélinisantes*, les oligodendrocytes qui permettent l'élaboration de la gaine de myéline autour de l'axone (**Figure 8**).

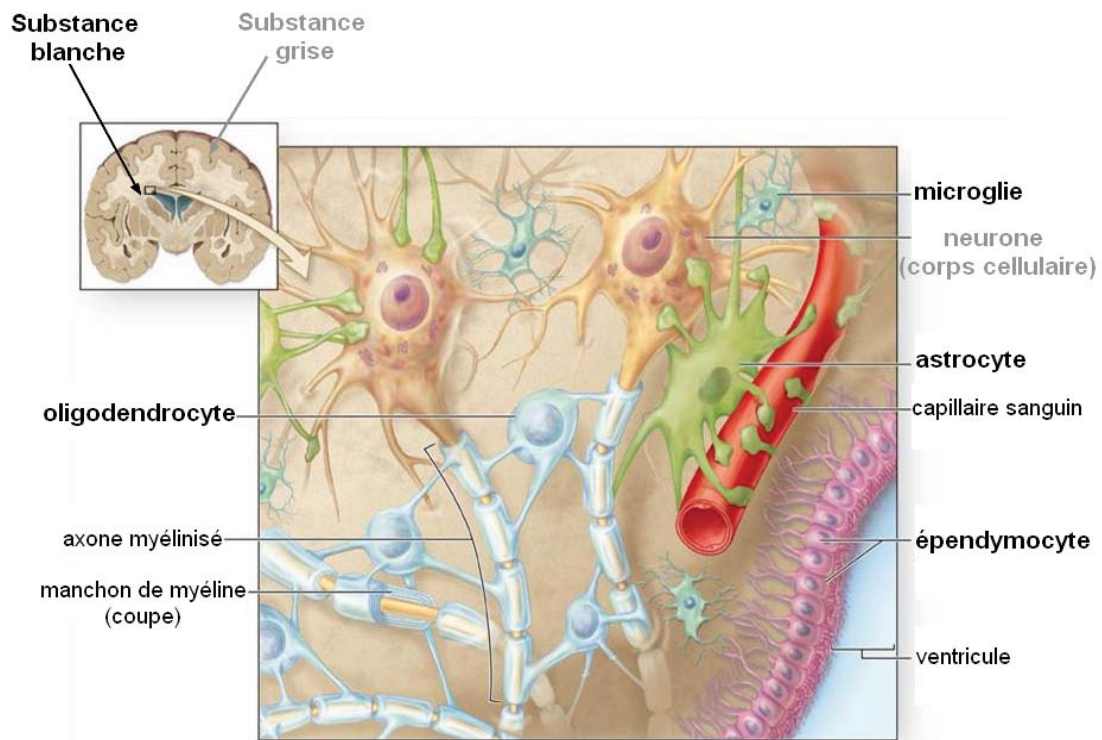


Figure 8. Illustration des différents types de cellules gliales.

Le système nerveux central se divise en deux compartiments structurellement distincts, la substance grise contenant les corps cellulaires de neurones et la substance blanche comprenant des cellules gliales non myélinisantes (les cellules de la microglie, les astrocytes et les épendymocytes) et des cellules gliales myélinisantes, les oligodendrocytes qui permettent l'élaboration de la gaine de myéline autour de l'axone.

(1) *Les épendymocytes*

(Pour revue, Bruni, 1998; Del Bigio, 2010)

Les *épendymocytes* sont les cellules qui constituent la membrane (ou *épendyme*) tapissant l'intérieur des cavités qui contiennent le *liquide céphalo-rachidien* (LCR), qui sont le *canal épendymaire* dans la ME et les *ventricules* dans le cerveau. L'épendyme est un épithélium simple qui borde les cavités ventriculaires du SNC. Les cellules épendymaires matures apparaissent le long du tube neural au moment de la régression des zones ventriculaires. Chez l'Homme, la membrane épendymaire est complète après 26-28 jours de gestation. Les cellules matures sont caractérisées morphologiquement par une forme cubique ou rectangulaire et un noyau assez rond avec un nucléole à peine visible. La surface est recouverte de microvillosités et la plupart des cellules présentent un amas de longs cils au centre. Les cellules épendymaires sont unies les unes aux autres à l'aide de jonctions apicales : *zonula adhaerens*, qui sont des jonctions communicantes. A la surface de la couche épendymaire, on retrouve un réseau d'axones supra-épendymaires. Les épendymocytes constituent une barrière perméable entre le LCR et le liquide interstitiel où baignent les cellules du SNC. Le flux de LCR est sécrété et contrôlé par l'épendyme qui transporte le LCR à partir des cavités ventriculaires grâce aux mouvements ciliaires. L'autre rôle de l'épendyme est de réguler les mouvements d'eau entre le LCR et le compartiment extracellulaire du SNC via d'autres structures appelées *aquaporines*. Il s'agit d'une variété de canaux transportant de l'eau de façon sélective. Les cellules épendymaires ont un rôle particulièrement important à jouer en termes de sécrétion de réabsorption entre le parenchyme cérébrale et le LCR. L'épendyme exerce également une activité d'endocytose, de phagocytose vis à vis de diverses molécules ou particules présentes dans le LCR.

Il semblerait que l'épithélium épendymaire cilié serve d'importantes fonctions pendant les stades précoces, notamment le rôle de support et de protection pour la zone sub-ventriculaire adjacente pendant le développement cérébrale mais, semble-t-il, également pour cellules sub-ventriculaires résiduelles dans le cerveau mature.

L'épendyme se résume donc en un ensemble de structures constituant à la fois une barrière de protection mais également une interface entre deux systèmes histologiques complémentaires.

(2) *Les cellules de la microglie*

(Pour revue, Kettenmann et al., 2011)

Les *cellules microgliales* sont de petites cellules spécifiques du SNC, appartenant au groupe des *macrophages*, et constituant la *microglie*. Elles ont une origine hématopoïétique et dérivent des pro-monocytes sanguins. Leur noyau est de forme ovoïde et ces cellules

présentent de nombreux prolongements longs, fins et très ramifiés (pseudopodes) les aidant à assurer leurs fonctions. Ces cellules possèdent un cytoplasme contenant de nombreux lysosomes et phagosomes participant à leur fonction d'épuration et de phagocytose des déchets au niveau du SNC.

Selon Pio del Rio-Hortega qui a introduit le concept qui reste encore d'actualité, les cellules microgliales (1) se trouvent dans le système nerveux pendant le développement, (2) utilisent les vaisseaux et les faisceaux de SB comme structures guides de migration pour pénétrer ainsi dans toutes les régions cérébrales, (3) développent un phénotype morphologique ramifié (*microglie au repos*) dans le cerveau mature, et (4) subissent des modifications après un événement pathologique, notamment l'acquisition d'une morphologie de type amœboïde. Une infection, un traumatisme, une ischémie, des pathologies neurodégénératives ou une activité neuronale altérée, c'est-à-dire tout élément provoquant une perte ou une perturbation de l'homéostasie cérébrale et présentant un danger potentiel pour le SNC peut produire des changements de forme des cellules microgliales, de l'expression de gènes et du comportement fonctionnel. Ces modifications sont résumées sous le terme « *d'activation microgliale* » (**Figure 9**). Les cellules microgliales vont alors proliférer dans le SNC et devenir des cellules présentatrices d'antigènes et secréter, en outre, des protéines cytotoxiques, pro-apoptotiques telles que des *cytokines pro- ou anti-inflammatoires*, des *protéinases* et des *radicaux libres*.

Le champ des activités microgliales couvre également la production de facteurs neurotrophiques et l'association physique avec les neurones endommagés. La microglie « activée » sert donc principalement de support et de protection pour l'intégrité fonctionnelle et structurale du SNC.

Une influence sur les profils d'expression et les propriétés fonctionnelles pourrait également résulter de l'architecture du tissu. Il a été démontré que la microglie de la SB et de la SG diffèrent dans l'expression d'un récepteur immunorégulateur (récepteur Tim-3). Des dissociations dans les profils populationnels indiqueraient que l'environnement myélinique requiert et/ou dicte un paramètre microglial particulier qui est différent de celui de la SG. Ces différences peuvent influencer le développement, le fonctionnement normal, mais également la vulnérabilité à l'inflammation. Il est intéressant de noter que l'hétérogénéité microgliale est le reflet de l'hétérogénéité des sous-populations oligodendrogiales dans les différentes régions de SG et SB.

D'un point de vue des interactions neurone-glie, il semblerait que des anomalies des performances synaptiques induisent des réponses locales des cellules microgliales qui peuvent alors initier le remodelage de l'architecture synaptique. Mais dans un même temps, la microglie peut également être impliquée dans un processus opposé à la création de nouvelles

synapses. La microglie participerait à la régulation de la synaptogenèse de façon précoce dans le cerveau post-natal.

Beaucoup de signaux convergent donc vers les cellules microgliales pour permettre activement le maintien ou l'altération de leur état fonctionnel et d'orchestrer de façon spécifique le répertoire des fonctions microgliales. Les transitions entre l'état de « surveillance » et les états activés s'effectuent lorsque la microglie perçoit l'apparition soudaine, la concentration anormale, ou un format moléculaire inhabituel de certains facteurs. La microglie peut être identifiée grâce à la reconnaissance de molécules associées à la surface cellulaire (par exemple, l'islectine B4 (IB4) qui reconnaît les glycans exprimés à la surface) ou de molécules intracellulaires/cytosoliques. Dans d'autres cas, les molécules ciblées ont une fonction de récepteurs, molécules d'adhésion ou enzymes dans les macrophages, par exemple l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18, MAC, CR3) qui lie le complément C3b et des protéines de la matrice extracellulaire. *Iba1* (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) est, quant à elle, une molécule ayant un rôle suggéré dans l'homéostasie calcique et permet l'identification précise de la microglie et de ses prolongements, du fait de l'importance de la signalisation calcique au sein des cellules microgliales. En recherche expérimentale ou neuropathologie, des récepteurs aux immunoglobulines (CD16/32/64), CD45, CD68, CD163, CD169, CD204, l'antigène F4/80 ou le récepteur au mannose, CD206, sont des cibles intéressantes avec une reconnaissance plus ou moins importante.

Les niveaux d'expression de certaines molécules, comme CD11b ou *Iba1*, sont particulièrement augmentés lors de l'activation microgliale. Les structures de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité sont uniquement exprimées par la microglie activée, incluant l'expression de molécules accessoires pour la présentation à l'antigène, B7.1 ou B7.2 (CD80/86).

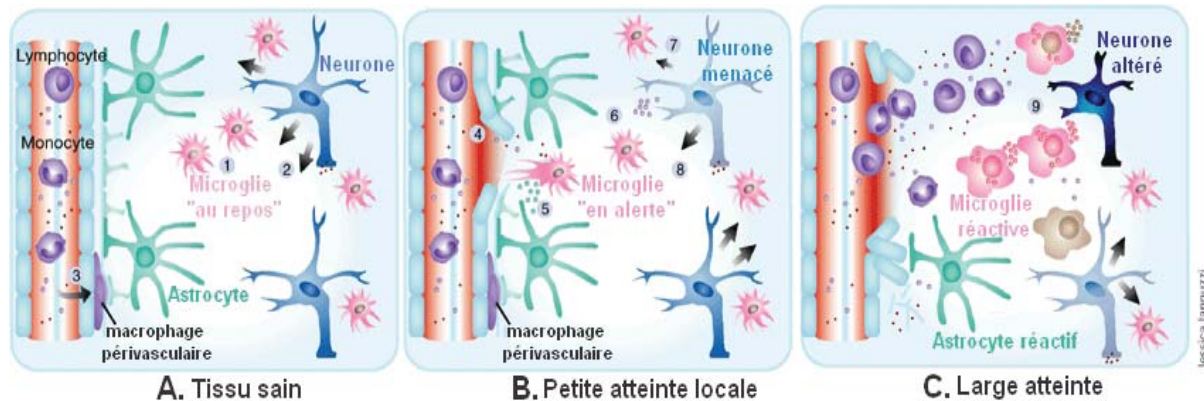


Figure 9. Les différents états d'activation de la microglie

A. Dans le tissu sain, la microglie au repos **1** a pour rôle de « surveiller » son environnement en émettant de fins prolongements et ainsi détecter, grâce à ses multiples récepteurs, les signes d'une intégrité fonctionnelle ou structurale altérée. Les neurones peuvent également délivrer des signaux laissant la microglie dans un état de surveillance, indiquant une fonction normale **2**. Il existe également des macrophages périvasculaires associés aux vaisseaux sanguins **3**.

B. Dès la détection d'anomalies homéostatiques localisées, la microglie répond rapidement par une réorganisation de ses prolongements et un changement de son profil d'activité **4**. La réponse peut être le résultat de libérations de molécules provenant des astrocytes au voisinage **5**. La microglie peut produire des facteurs neurotrophiques pour soutenir les neurones menacés **6**. La rupture de la communication du signal de « repos » permettrait aux neurones menacés de faire appel à une assistance microgliale **7**. Chaque neurone peut aussi émettre des signaux indiquant un fonctionnement altéré en produisant des molécules qui ne sont pas habituellement émises ou à des concentrations critiques **8**. Les cellules microgliales ont ainsi la capacité de limiter les dommages et de restaurer l'homéostasie.

C. Des dommages plus importants du SNC mènent à des changements plus drastiques du phénotype fonctionnel de la microglie. Selon la nature du stimulus et le contexte, les cellules microgliales ont besoin d'acquérir un comportement réactif. Une réponse microgliale excessive, soutenue ou inadaptée peut mener à une importante perte neuronale et gliale **9**.

(D'après, Cryan et Holmes, 2005)

(3) *Les astrocytes*

(Pour revue, Sofroniew et Vinters, 2010; Eroglu et Barres, 2010)

Les *astrocytes* sont les cellules gliales spécialisées les plus abondantes du SNC. Ils présentent une morphologie étoilée émettant de nombreux prolongements cytoplasmiques. Ils exercent de nombreuses fonctions essentielles dans la totalité du SNC. Les astrocytes répondent à toutes les formes d'agressions du SNC par un processus appelé *astroglie réactive*, qui est devenu le marqueur pathologique des lésions structurelles du SNC. L'astroglie réactive consiste en un continuum de changements qui se produisent de façon contexte-dépendante et régulée par des événements de signalisation spécifiques. Ces changements peuvent aller de simples altérations réversibles dans l'expression de certains gènes et une hypertrophie cellulaire, à la formation de cicatrices à long terme associées à un réarrangement de la structure tissulaire.

Les astrocytes sont considérés comme des cellules neuroprotectrices assurant le maintien d'un micro-environnement optimal pour le fonctionnement neuronal. L'étendue de leurs prolongements et leur richesse en éléments du cytosquelette parmi lesquels la *protéine GFAP* (Glial fibrillary acid protein), relativement spécifique des astrocytes actifs, leur confèrent un rôle structurel dans le SNC. GFAP est une protéine de la famille des filaments intermédiaires, incluant la vimentine (également exprimée dans l'astrocyte) et la nestine, et qui possède d'importantes fonctions cyto-architecturales. Il apparaîtrait que GFAP ne serait pas indispensable pour l'apparence et la fonction normales des astrocytes dans le SNC mais essentielle pour les processus d'astroglie réactive et la formation de la cicatrice gliale.

Comme la plupart des cellules gliales, les astrocytes ont longtemps été considérés essentiellement pour leur rôle de support et d'entretien du tissu nerveux. Mais de plus en plus d'évidences plaident en faveur d'une implication beaucoup plus importante des astrocytes dans la communication nerveuse. On connaît depuis longtemps leur rôle dans l'apport du glucose nécessaire à l'activité nerveuse. Grâce à leur morphologie et leur localisation contre la paroi des capillaires sanguins cérébraux, le glucose peut pénétrer dans les astrocytes où il est partiellement métabolisé et retransmis aux neurones. Il semble même qu'une activité synaptique plus intense favorise un apport plus élevé de glucose en activant le travail des astrocytes. Les astrocytes jouent également un rôle direct dans la transmission synaptique grâce à la libération de molécules synaptiquement actives telles que le glutamate, les purines (ATP et adénosine), le GABA et la D-sérine. La libération de tels gliotransmetteurs survient en réponse aux changements de l'activité synaptique neuronale.

On sait aussi que les astrocytes sont couplés les uns aux autres par des " *gap-jonctions* " à travers lesquels peuvent circuler divers métabolites. C'est par ces jonctions que les astrocytes

évacuent vers les capillaires le potassium extracellulaire excédentaire généré par une intense activité neuronale. Aujourd'hui, il apparaîtrait que les astrocytes communiquent en réseau pour se comporter comme un seul et même élément. À travers ce réseau se propageraient par exemple des vagues d'ions calcium dont l'effet régulateur pourrait se répercuter dans un grand nombre de synapses au même moment. Les prolongements astrocytaires qui entourent les synapses pourraient ainsi exercer un contrôle plus global sur la concentration ionique et le volume aqueux dans les fentes synaptiques. Le réseau astrocytaire constituerait donc un système de transmission non-synaptique qui se superposerait au système neuronal pour jouer un rôle majeur de modulation des activités neuronales. Cette association entre l'astrocyte et les synapses est à la fois structurale et fonctionnelle et donne lieu au concept de «*synapse tripartite*» (**Figure 10**) où les synapses sont définies comme les ensembles pré- et post-synaptiques des neurones associés aux prolongements gliaux qui les entourent.

Les astrocytes jouent également un rôle primordial pendant le développement des substances grise et blanche. Les frontières moléculaires formées par les astrocytes participent au guidage de la migration des axones en développement et de certains neuroblastes. De plus, les astrocytes sont essentiels pour la formation et la fonction des synapses en développement grâce à des signaux moléculaires tels que la *thrombospondine*. En ce qui concerne le développement de la SB, il apparaît que la perte ou le dysfonctionnement des connexines et des gap-jonctions astrocytaires mènent à une dysmyélinisation.

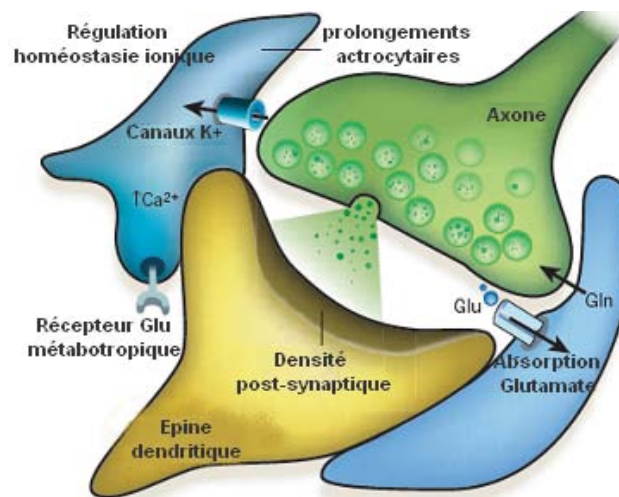


Figure 10. Schématisation de la synapse tripartite

Les prolongements astrocytaires sont étroitement associés aux synapses. Cette association est à la fois structurale et fonctionnelle. Les prolongements astrocytaires péri-synaptiques contiennent des transporteurs qui captent le glutamate (Glu) qui est libéré dans la synapse et retourne au neurone sous forme de glutamine (Gln). Les récepteurs au glutamate des astrocytes, tels que les récepteurs au glutamate métabotropiques, détectent la libération synaptique de glutamate, qui en retour induit une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans les astrocytes. Une des principales fonctions de la glie au niveau synaptique est de maintenir l'homéostasie ionique, par exemple en régulant les concentrations extracellulaires de K^+ et le pH. (D'après, Eroglu et Barres, 2010)

(4) Les oligodendrocytes

(4.a) Définition

Les OLs sont les cellules myélinisantes du SNC, équivalentes aux *cellules de Schwann* dans le SNP. Lorsqu'ils deviennent matures au cours du développement du SNC, ils acquièrent une forte capacité de production de composants protéiques et lipidiques et émettent des prolongements cytoplasmiques en direction des axones; ces prolongements vont s'enrouler à plusieurs reprises en spirale autour de l'axone pour former une gaine compacte lipoprotéique multi-lamellaire, appelée *gaine de myéline*. Un seul OL présente jusqu'à 60 prolongements cytoplasmiques, sur un même ou sur différents axones, qui serviront à l'élaboration de nombreux segments de myéline. A son pic de myélinisation, un OL peut produire quotidiennement jusqu'à 5000 μm^2 de gaine et myéliniser jusqu'à 15 axones. La gaine de myéline une fois formée, va permettre une conduction saltatoire et rapide de l'influx nerveux le long de l'axone (Hudson, 2001; Bradl et Lassmann, 2010). *Plus de détails concernant cette gaine de myéline seront donnés dans le Chapitre II.*

Les OLs sont divisés en 2 catégories, les *OLs inter-fasciculaires*, disposés en rangs entre les fibres nerveuses de la SB, donc ce sont eux qui ont pour rôle la fabrication de la gaine de myéline (ils sont donc également appelés OLs myélinisants), et les *OLs péri-neuronaux* (ou satellites ou OLs non myélinisants) situés à proximité des corps cellulaires des neurones et présentant donc une action métabolique encore aujourd'hui mal caractérisée, principalement dans la SG.

Morphologiquement, les OLs se distinguent des astrocytes par leur plus grande densité cytoplasmique et nucléaire, l'absence de fibrilles et de glycogène dans le cytoplasme, et un très grand nombre de microtubules au niveau des prolongements.

Les OLs ont un rôle critique pour le maintien de la structure axonale et sa survie. Les OLs pourraient exercer une fonction neuroprotectrice par l'apport d'un support trophique pour les corps cellulaires neuronaux grâce à la production de nombreux facteurs trophiques (Benarroch, 2009).

(4.b) Mécanismes de maturation des OLs

Les signaux qui guident les cellules souches neurales vers une voie de différenciation oligodendrocytaire incluent de nombreuses molécules de signalisation et facteurs de croissance. Dans la ME en développement, la *notochoorde* (ou mésoblaste axial) est la source de signaux pour la production des *précurseurs des OLs* (OPCs). Beaucoup des propriétés de la notochoorde sont attribuables au fait qu'elle produise la molécule *sonic hedgehog* (Shh). Des concentrations similaires de Shh sont requises pour l'induction des neurones moteurs et des

OPCs, indiquant que le développement de ces deux types cellulaires est étroitement lié et que d'autres signaux doivent intervenir pour générer les OPCs, comme par exemple un signal *neuréguline* (NRG), le *facteur de croissance gliale* (GGF). Ces OPCs vont ensuite migrer le long de la ME et se différencier en OLs producteur de myéline. Dans l'encéphale, les OPCs sont originaires de l'éminence ganglionnaire médiane (formée par les neuroblastes qui migrent dans la SB télencéphalique) et l'aire entopédonculaire antérieure au niveau ventral. Ces OPCs occupent la totalité du télencéphale embryonnaire incluant le cortex cérébrale, et sont suivis par une seconde vague d'OPCs dérivés des éminences ganglionnaires latérales et/ou caudales. Enfin, la troisième vague d'OPCs survient au sein même du cortex postnatal. Bien qu'elles soient d'origines différentes ces populations d'OPCs sont fonctionnellement redondantes, mais entrent en compétition pendant le développement (Bradl et Lassmann, 2010).

La migration des OPCs est guidée par des signaux régulateurs. Trois différentes classes de molécules sécrétées semblent impliquées dans la migration des OPCs : (1) les facteurs de croissance, comme le *facteur de croissance dérivé des plaquettes* (PDGF), le *facteur de croissance fibroblastique* (FGF) ou le *facteur de croissance des hépatocytes* (HGF) ; (2) les molécules chimiotropiques, comme les *nétrines* et les *sémaphorines* sécrétées ; (3) la *chimiokine CXCL1* (pour chemokine (C-X-C motif) ligand 1). La migration des OPCs n'est pas seulement contrôlée par des molécules sécrétées mais également par des mécanismes de contact impliquant de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire et des molécules de la surface cellulaire, telles que les *N-cadhérines*. A partir de ces différentes molécules, la migration des OPCs basée sur le contact peut alors s'accomplir sur les matrices extracellulaires, tractus axonaux et surfaces astrocytaires. Arrivés à leur destination finale, certains OPCs persistent jusqu'au stade adulte, tandis que la grande majorité se différencie en OLs pré-myélinisants exprimant *GalC*, puis OLs myélinisants exprimant *MBP* (pour myelin basic protein), *PLP* (pour proteolipoprotein) et *MOG* (pour myelin oligodendrocyte glycoprotein) (Bradl et Lassmann, 2010).

La différenciation des OPCs en OLs et le début de la myélinisation sont spatialement et temporellement régulés. Plusieurs facteurs solubles ont un rôle dans le programme de différenciation et la survie des OLs, tels que le *facteur de croissance à l'insuline 1* (IGF-1), l'*hormone thyroïdienne triiodothyronine* (T3), la *neurotrophine 3* (NT-3) et le *facteur neurotrophique ciliaire* (CNTF) (Hudson, 2001). Ce processus de différenciation implique également des processus de signalisation entre le récepteur *Notch 1*, son ligand *Jagged 1*, localisé à la surface axonale, et la *γ -secretase* (Bradl et Lassmann, 2010). Bien qu'il ait déjà été montré que de nombreux régulateurs transcriptionnels influencent la différenciation des

OPCs en OLs, des études récentes ont mis en évidence une étape de maturation supplémentaire dans la transition des OLs en cellules génératrices de myéline. Le *facteur régulateur du gène de la myéline* (MRF), la *protéine à doigts de zinc 191* (Zfp 191) et le *facteur de transcription Ying Yang 1* (YY1) auraient une implication après la différenciation. YY1 aurait une action répressive sur les inhibiteurs transcriptionnels en recrutant des *histones déacétylases* (HDACs). Ces HDACs ont pour rôle de libérer les groupes acétyles des histones pour permettre la compaction de la chromatine et ainsi inhiber la transcription. Ce mécanisme pourrait être responsable de la répression de voies qui normalement empêchent la différenciation des OLs (Fancy et al., 2011) (**Figure 11 et 12**).

Certaines molécules permettent le contrôle de la survie des OLs, comme le facteur NRG. Cette protéine appartient à la famille de protéines contenant un motif *facteur de croissance épidermique-like* (EFG) qui active les récepteurs tyrosine kinase associés à la membrane : *ErbB2*, *ErbB3* et *ErbB4*. En l'absence de *ErbB2*, l'OL ne termine pas sa différenciation, ni la formation de la gaine de myéline autour des axones (Simons et Trajkovic, 2006).

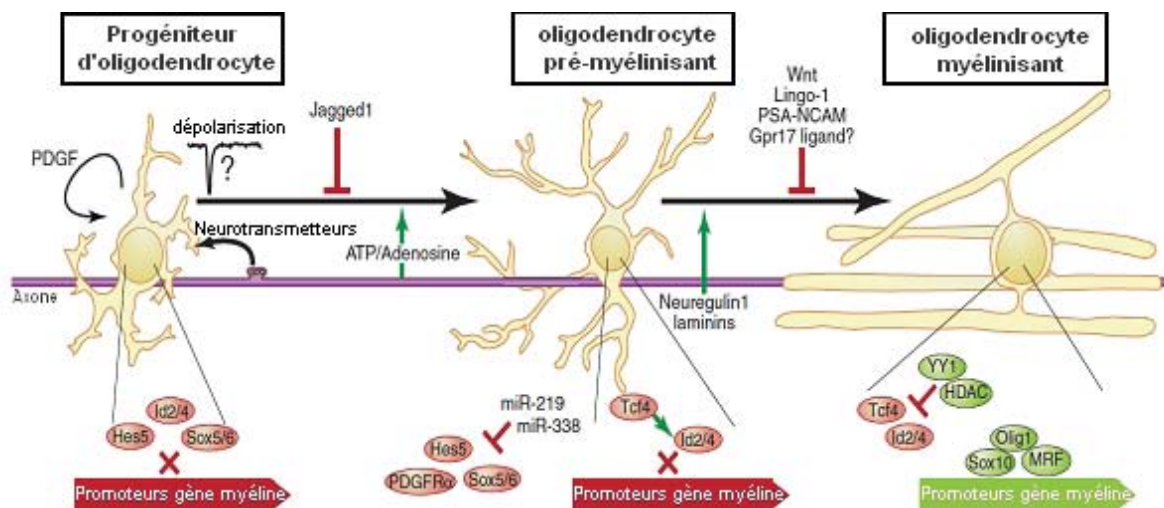


Figure 11. Représentation schématique de la lignée oligodendrocytaire.

Des facteurs intrinsèques et extrinsèques influencent la différenciation des oligodendrocytes et la myélinisation de chaque axone. La différenciation oligodendrocytaire requiert l'intégration de multiples signaux extracellulaires grâce à la coordination de multiples voies intrinsèques. La myélinisation est régulée à la fois au niveau de différenciation oligodendrocytaire et plus subtilement au niveau de chaque axone. (D'après, Emery, 2010).

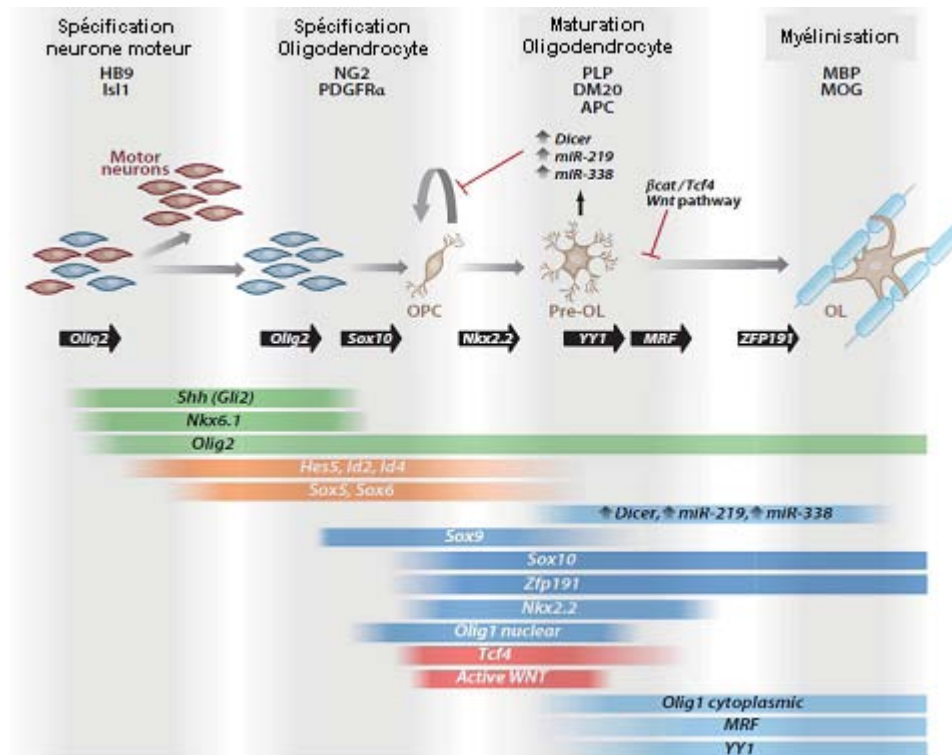


Figure 12. Schématisation des multiples mécanismes influençant la différenciation et le développement des oligodendrocytes (OLs) à divers stades développementaux.

Le schéma résume les interactions impliquées dans le « switch » neurone-glie et la maturation des précurseurs des oligodendrocytes (OPC) produits à partir du tube neural. Les flèches noires représentent les transitions de la lignée oligodendrocytaire dépendantes de facteurs de transcriptions spécifiques, et les gradients de couleur représentent les profils d'expression temporels.

Les OPCs sont marqués par l'expression de PDGFR α (pour platelet-derived growth receptor alpha) et NG2 (chondroïtin sulphate proteoglycan), tandis que les OLs expriment *adenomatous polyposis coli* (APC) et la protéolipoprotéine (PLP). Les OLs myélinisants expriment la protéine basique de la myéline (MBP) et la glycoprotéine oligodendrocytaire (MOG) et permettent l'élaboration d'une myéline compacte. Pendant l'embryogenèse, l'exposition à sonic hedgehog (Shh) est nécessaire jusqu'à la migration des OPCs de la zone ventriculaire, reflétant des rôles essentiels de Gli2 (pour glioma-associated oncogene family zinc finger 2) et des facteurs de transcription, Nkx6.1 et Nkx6.2. Ces activités sont requises afin que le tube neural puisse produire des neurones moteurs et des OLs. Le « switch » de production de lignée cellulaire semble impliquer une sous-régulation de facteurs neurogéniques (comme neurogenine 2). Les phases plus tardives de maturation des OPCs sont Shh-indépendantes et requièrent Sox10, Nkx2.2 et Olig1. Plusieurs régulateurs clés de la myélinisation développementale ont récemment été rapportés, tels que YY1, MRF, ZFP191 et Tcf4, ainsi que des voies de signalisation intracellulaires comme Wnt, et également un contrôle post-transcriptionnel via microARN. (D'après, Fancy et al., 2011).

(4.c) Mécanismes de mort des OLs

(Pour revue, Bradl et Lassmann, 2010)

Les OLs sont particulièrement sensibles aux altérations oxydatives. Ces dernières peuvent agir en concert avec la voie des sphingomyélinases/céramides qui s'active sous l'effet du stress oxydatif, de médiateurs inflammatoires ou d'infection. Une fois libérés, les céramides peuvent activer des cascades de signalisation pro-apoptotique et aboutir à la mort des OLs.

Les OLs expriment également de nombreuses molécules les rendant prédisposés à la mort cellulaire excitotoxique, notamment, les *récepteurs AMPA* (pour α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate), *kaïnate* et *NMDA* (pour N-méthyl-D-aspartate) qui sensibilisent les OLs à la toxicité au glutamate, et le *récepteur à l'ATP* (adénosine triphosphate), *P2X7*, qui les prédisposent aux dommages provoqués par des niveaux importants d'ATP extracellulaire.

La mort des OLs peut également résulter de l'exposition à des *cytokines inflammatoires* qui peuvent agir de façon directe, ou indirecte à travers la stimulation de la production de *radicaux libres* dans la microglie et éventuellement dans les astrocytes. Les radicaux oxydés oxygénés et nitriques sont particulièrement toxiques pour la mitochondrie par l'interaction et le blocage de nombreuses protéines de la chaîne respiratoire. Par exemple, la *cuprizone* (un chélateur du cuivre) ou l'intoxication aux *cyanides*, interférant tous deux avec le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, induisent une apoptose sélective des OLs et une démyélinisation.

C. Fonctions du SNC

Notre système nerveux s'acquitte de nombreuses tâches complexes. Il nous permet de percevoir différentes sensations, d'acquérir le langage, de mémoriser des événements, mais il émet aussi des signaux qui déterminent les mouvements du corps et régulent le fonctionnement des organes internes. Ces tâches se regroupent en plusieurs fonctions fondamentales. Au cours de ce travail nous ne détaillerons que les fonctions motrices et sensorielles ainsi que deux sous-types de fonctions cognitives : la mémoire et l'anxiété.

1. La fonction motrice

Une fois que l'information sensorielle est intégrée, le système nerveux peut y répondre, c'est-à-dire qu'il peut déterminer la réponse motrice à y apporter, par exemple une contraction musculaire ou une sécrétion glandulaire. Les neurones qui accomplissent cette fonction sont les *neurones moteurs*, aussi appelés *neurones efférents* ou encore *motoneurones*. Ils transmettent l'information provenant de l'encéphale vers la ME ou l'information provenant de l'encéphale et de la ME vers les effecteurs (les muscles et certaines glandes) par l'intermédiaire des nerfs crâniens et des nerfs spinaux. En stimulant les effecteurs, les neurones moteurs déclenchent les contractions musculaires et les sécrétions glandulaires.

2. La fonction sensorielle

Un système sensoriel est une partie du système nerveux responsable de la sensation. Il regroupe les récepteurs sensoriels, les voies nerveuses, et les parties du cerveau responsables du traitement de l'information sensorielle. Les récepteurs sensoriels détectent les stimuli internes, par exemple les variations d'homéostasie, et les stimuli externes, par exemple un stimulus tactile. Les *neurones sensitifs*, ou *neurones afférents*, transmettent l'information sensorielle de la périphérie à l'encéphale et à la ME par l'intermédiaire des nerfs crâniens et des nerfs spinaux.

L'ensemble des systèmes sensoriels se divisent en *sensibilité générale* ou *somesthésie* et en *sens dits spécifiques* : la vision, l'ouïe, l'odorat, le goût, et le toucher.

a. Les sens spécifiques

- *La vision* : La vision recouvre l'ensemble des mécanismes physiologiques et psychologiques par lesquels la lumière émise ou réfléchi par l'environnement détermine les détails des représentations sensorielles, comme les formes, les couleurs, les textures, le mouvement, la distance et le relief. Ces mécanismes font intervenir l'œil, organe récepteur

de la vue, mais aussi des zones spécialisées du cerveau, notamment le *cortex visuel*, à l'origine des processus cognitifs complexes.

- *L'ouïe* : Il s'agit de la capacité de percevoir des sons. Elle résulte de la propagation d'ondes longitudinales dans l'atmosphère émises dans une bande de fréquences allant de 20 à 20 000 hertz chez l'Homme (et au-delà chez les rongeurs), puis reçues et adaptées par l'organe de l'audition, l'oreille. Le pavillon de l'oreille externe focalise et amplifie l'onde qui passe dans le conduit et met en vibration le tympan. Puis il est transmis par la chaîne d'osselets jusque dans l'oreille interne. Une fois sorti de l'oreille interne, le nerf auditif va rejoindre le cerveau au niveau du tronc cérébral pour composer les voies auditives centrales. Les informations auditives contenues dans le nerf sont traitées tout au long de leur parcours en passant par plusieurs étages de relais pour atteindre finalement l'aire auditive ou cortex auditif primaire. Les quatre premiers étages situés dans le tronc cérébral, sont : le noyau cochléaire, le complexe olivaire, le noyau du lemnisque latéral et le collicule inférieur au niveau du cervelet, relais principal du traitement des informations auditives. Ces informations arrivent ensuite dans le cerveau au niveau du thalamus auditif ou corps genouillé médian pour atteindre finalement l'aire auditive située dans un sillon du lobe temporal du cerveau.

- *Le goût et l'odorat* : Le goût est le sens qui permet d'identifier les substances chimiques sous forme de solutions par l'intermédiaire de chémorécepteurs situés sur la langue. L'odorat, qui permet de détecter les substances chimiques volatiles, est un sens proche de celui du goût. Cette fonction est assurée par la muqueuse olfactive composée de neurones olfactifs bien plus sensibles que les neurones gustatifs. C'est ensuite au niveau du de centres corticaux, que toutes ces informations sont traitées par l'organisme.

- *Le toucher* : Le toucher fournit des informations par contact de la peau avec la surface des objets. La peau présente deux couches. La première couche superficielle de revêtement s'appelle l'*épiderme*. La deuxième couche est une partie profonde où se trouvent les terminaisons nerveuses, elle s'appelle le *derme*. L'épaisseur de la peau est de 1 à 4 millimètres selon les parties du corps. Elle est très élastique, ce qui lui permet une certaine plasticité. C'est par la peau que proviennent les sensations du toucher : *tactile* (reconnaissance de textures) ou *thermique* (le chaud, le froid). Ce sens est une composante de la somesthésie au sens large.

b. La somesthésie : le cas particulier de la douleur

La *somesthésie* désigne un ensemble de différentes sensations (pression, température, douleur) qui proviennent de plusieurs régions du corps (peau, tendons, articulations, viscères). Si l'on considère la provenance des informations traitées, on note que la somesthésie concerne 3 types de sensibilité : *extéroceptive* (sensibilité aux stimulations extérieures), *proprioceptive* (position et mouvements du corps) et *intéroceptive* (sensibilité interne, viscérale). Ces sensations sont élaborées à partir des informations fournies par de nombreux récepteurs sensitifs du système somatosensoriel, situés dans les tissus de l'organisme (mécanorécepteurs du derme et des viscères, fuseaux neuromusculaires des muscles, fuseaux neurotendineux des tendons...). Le système somatosensoriel devient progressivement fonctionnel à partir du troisième mois de gestation chez l'Homme. La détection de l'information se fait grâce à des récepteurs constitués de *neurones sensitifs périphériques* dont le corps cellulaire est situé dans les *ganglions spinaux*. Les récepteurs de la somesthésie sont nombreux et spécialisés : *mécanorécepteurs* pour la sensation de pression, *thermorécepteurs* pour la chaleur et le froid et les *nocicepteurs* pour la douleur (ou nociception) qui possèdent diverses modalités. Tous ces récepteurs, à partir de l'état des tissus de l'organisme, participent à l'élaboration des différentes sensations corporelles tactiles, thermiques, proprioceptives, kinesthésiques et nociceptives. Les stimuli détectés par les récepteurs somesthésiques sont transmis par les nerfs dans la ME, le tronc cérébral et le cerveau. Le système somesthésique est le seul système sensoriel ayant des projections, souvent directes, sur l'ensemble du SNC : ME, substance réticulée mésencéphalique et diencephalique, thalamus, hypothalamus, système limbique, cervelet et cortex cérébral reçoivent des afférences somesthésiques.

(1) Mécanismes périphériques impliqués dans la douleur

Au niveau périphérique, le message nociceptif est généré au niveau des terminaisons libres amyéliniques, constituant des arborisations plexiformes dans les tissus cutanés, musculaires et articulaires. L'information est ensuite véhiculée par des fibres nerveuses périphériques qui, rassemblées au sein des nerfs, envoient leurs messages vers la ME où s'effectue le premier relais. Ces protoneurones à terminaisons libres dont les fibres sont *faiblement myélinisées* (*fibres A δ*) ou *amyéliniques* (*fibres C*) sont appelés *nocicepteurs* lorsqu'ils encodent préférentiellement des stimuli nocifs (Le Bars et Adam, 2002; Le Bars et Willer, 2004).

(1.a) Les fibres nociceptives

(Pour revue, Le Bars et Adam, 2002; Le Bars et Willer, 2004; Coutaux et al., 2005)

Les nerfs cutanés sont divisés en trois grandes catégories de fibres dont le corps cellulaire se situe dans les ganglions rachidiens et qui constituent les *neurones primaires* ou *afférences primaires* (**Figure 13**) :

- Les *fibres A β* de large diamètre (6-12 μm), recouvertes d'une large gaine de myéline conduisant rapidement l'influx nerveux (30 à 70 m/s chez l'homme), transmettent les informations tactiles et proprioceptives.
- Les *fibres A δ* de diamètre moyen (1-5 μm), peu myélinisées (ou mécanorécepteurs), conduisent l'influx nerveux à vitesse moyenne (5 à 30 m/s) et sont liées à des sensations de piqure brève et localisée. Elles transmettent des informations de type nociceptives et thermiques. Elles projettent au niveau des couches I et II de la corne dorsale spinale.
- Les *fibres C* amyéliniques de faible diamètre (0,2-1,5 μm) conduisent très lentement l'influx (0,5 à 2 m/s) et impliquent des sensations de brûlure prolongée et diffuse dues à une latence de détection plus longue. Elles projettent également au niveau des couches I et II de la corne dorsale spinale. Au sein des fibres C qui constituent 60 à 90% des fibres afférentes cutanées, les *nocicepteurs polymodaux* sont les plus représentés. Ils répondent à des stimuli nociceptifs de différentes natures (thermique, mécanique, chimique) et sont pour la plupart activés par des intensités de stimulation non douloureuses.

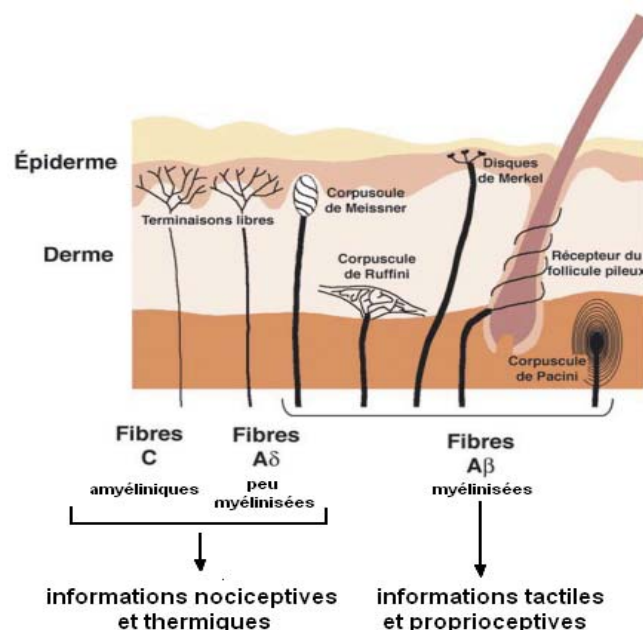


Figure 13. Les trois grandes catégories de fibres nerveuses.

Les informations nociceptives et thermiques sont relayées par les fibres C amyéliniques et les fibres A δ peu myélinisées tandis que les informations proprioceptives et tactiles empruntent les fibres A β myélinisées. (D'après, Le Bars et Willer, 2004)

Il existe différentes classes de fibres sensorielles amyéliniques suivant leur profil neurochimique. Ainsi on distingue deux sous-populations de fibres C nociceptives:

- Les fibres dites « *peptidergiques* » synthétisant la *substance P* et le *calcitonin gene related peptide* (CGRP) et sensibles au facteur de croissance *nerve growth factor* (NGF) dont elles expriment les récepteurs spécifiques. Elles se projettent dans les couches les plus superficielles de la corne postérieure de la ME (I et Ilo) qui contiennent des neurones exprimant le récepteur à la substance P, *NKI* (**Figure 14**). Cette catégorie de fibres est à l'origine de l'inflammation de type neurogène qui induit une hyperalgésie secondaire.
- Les fibres dites « *non peptidergiques* » exprimant le récepteur, *RET*, du *glial derived neurotrophic factor* (GDNF), une sous-population de *récepteurs purinergiques* (P2X₃) et un site de liaison pour l'IB4. Elles se projettent exclusivement dans la couche Ili de la corne postérieure de la ME (**Figure 14**), qui ne contient que des interneurons répondant uniquement aux stimuli mécaniques non nociceptifs et exprimant la *protéine-kinase Cγ* (PKCγ).

Les différentes fibres nerveuses périphériques conduisent donc les messages afférents à différentes vitesses et vont acquérir une distribution particulière (**Figure 15**) en fonction du diamètre et de la présence de myéline.

(1.b) Les récepteurs élémentaires

(Pour revue, Le Bars et Adam, 2002; Le Bars et Willer, 2004; Coutaux et al., 2005)

Il existe un certain nombre de récepteurs biochimiques qui tapissent la membrane des fibres afférentes primaires. Certains d'entre eux sont des transducteurs, c'est-à-dire qu'ils sont capables de transformer un stimulus physique en un courant dépolarisant la membrane et sont souvent spécifiques. Ces transducteurs élémentaires sont classés en trois catégories (**Figure 16**):

- Les *récepteurs vanilloïdes* (au piment): Les vanilloïdes constituent une famille d'irritants naturels, dont le plus connu est la *capsaïcine* extraite du piment, qui activent essentiellement les fibres C polymodales. Leur récepteur cutané est le *récepteur ionotropique vanilloïde VR-1* (ou *TRPV1*), appartenant à la famille des *canaux ioniques « transient receptor potential »* (TRP). Cette famille de récepteurs est sensible aux stimuli mécaniques, thermiques (chaud et froid) et à certaines substances chimiques.

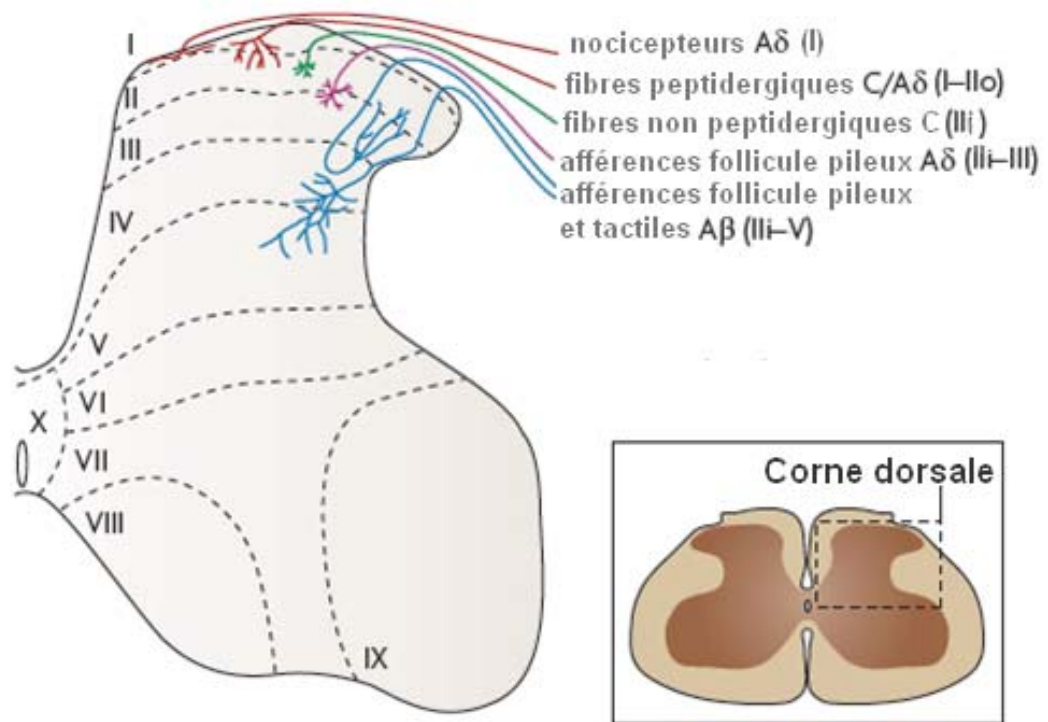


Figure 14. Zones de projection des différentes catégories de fibres nociceptives au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière.

(D'après, Todd, 2010)

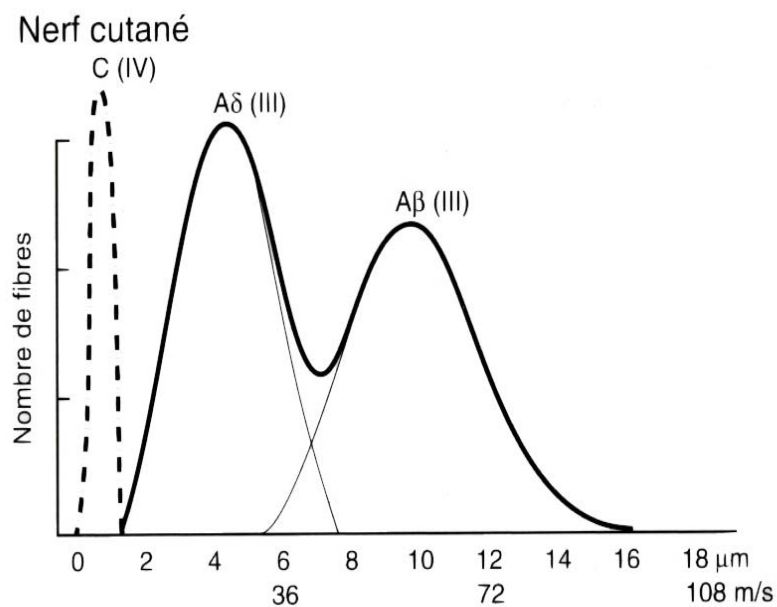


Figure 15. Distribution des fibres périphériques dans les nerfs cutanés en fonction du diamètre et de la vitesse de conduction.

(D'après, Boureau, 2011)

Les TRP sont classés en plusieurs groupes parmi lesquels on retrouve les TRPV (vanilloïdes), TRPM (mélastatine), TRPA (ankrin). On peut noter qu'il existe cinq classes de récepteurs TRPV (TRPV1 à TRPV5). TRPV1 est un canal non sélectif laissant préférentiellement passer le calcium et répondant à des températures à partir de 48°C. Son seuil peut être abaissé lorsqu'il est phosphorylé par l'intermédiaire d'une protéine-kinase A, elle-même activée par les prostaglandines et la sérotonine ou par l'intermédiaire d'une protéine-kinase C, elle-même activée par la bradykinine et l'histamine. L'activité de TRPV1 est donc régulée par l'environnement biochimique, se traduisant par exemple par la baisse de son seuil d'activation en cas d'inflammation.

- *Les récepteurs à l'acidité* : Il s'agit d'une superfamille de canaux sodiques appelés *canaux ioniques sensibles à l'acidité* (ou ASIC pour *acid-sensing ionic channel*). Certains sont exprimés dans les fibres afférentes primaires de petit diamètre et s'activent dès que le pH est inférieur à 6,9.
- *Les récepteurs purinergiques* : L'ATP se lie aux *récepteurs purinergiques*, *ionotropiques* (P2X, dont certains sont exprimés dans les neurones sensoriels afférents et le plus intéressant étant le récepteur P2X₃ exprimé uniquement par les neurones non peptidergiques), ou *métabotropiques* (P2Y). L'ATP s'hydrolyse alors en adénosine qui permet l'activation des nocicepteurs.

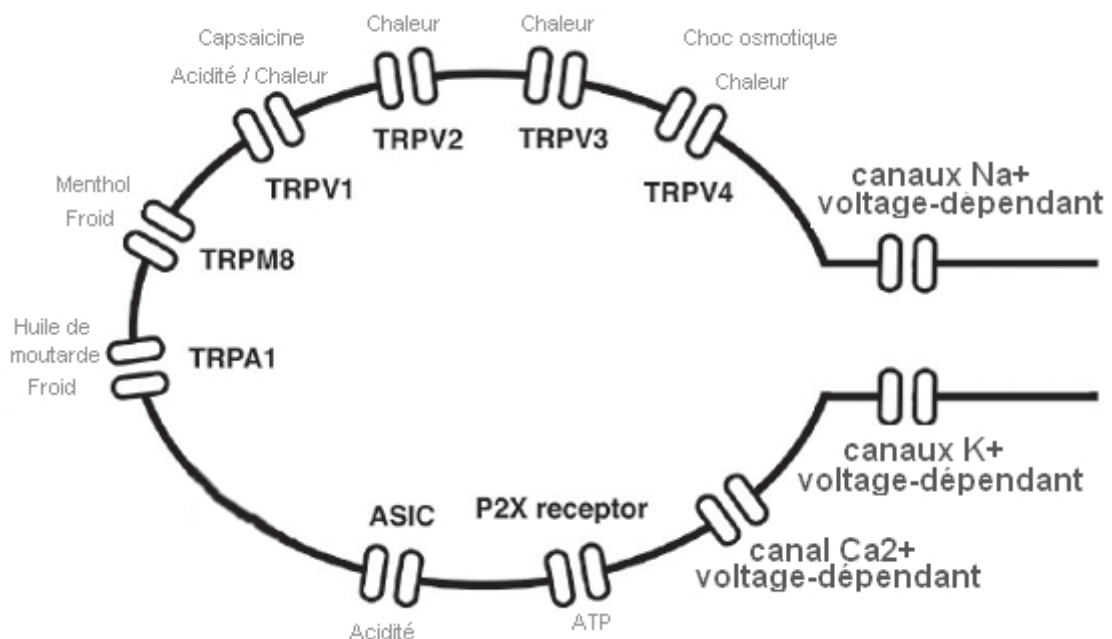


Figure 16. Canaux ioniques, exprimés dans les neurones sensoriels, potentiellement impliqués dans les mécanismes de nociception.

(D'après, Lee et al., 2005)

(1.c) Les canaux voltage-dépendants

(Pour revue, Le Bars et Adam, 2002; Le Bars et Willer, 2004; Coutaux et al., 2005)

Les canaux voltage-dépendants sont présents sur la membrane des terminaisons des fibres afférentes primaires, qu'elles soient ou non myélinisées, et déclenchent des potentiels d'action lorsque cette membrane est suffisamment dépolarisée. Il s'agit en général de canaux à bas seuil dont la cinétique d'inactivation est rapide et peut être bloquée par la tétrotoxine (TTx). Les anti-arythmiques, les anticonvulsivants et les anesthésiques locaux bloquent principalement ces canaux sodiques. On peut noter qu'au cours de l'inflammation, la synthèse de canaux tétrotoxine-résistant est augmentée. La mise au point d'antagonistes spécifiques représente donc une piste à suivre pour l'amélioration du traitement de la douleur.

(2) Mécanismes spinaux impliqués dans la douleur : Les voies ascendantes

(Pour revue, Le Bars et Adam, 2002; Le Bars et Willer, 2004)

La majorité des fibres afférentes primaires atteignent le SNC via les racines rachidiennes postérieures. Les fibres A β projettent leurs axones vers la substance grise médullaire de la corne postérieure et vers les noyaux du bulbe. Les neurones de ces noyaux envoient leurs axones, entre autres, vers le thalamus latéral qui envoie des projections vers le cortex somesthésique primaire, permettant ainsi une communication rapide de l'information sur la localisation, l'intensité et la durée du stimulus. Quant aux fibres A δ et C, elles se divisent en une branche ascendante et descendante qui émettent des collatérales vers la corne postérieure de la moelle sur des segments adjacents où convergent des afférences nociceptives cutanées, musculaires et viscérales, dans les couches I et V.

Deux groupes principaux de substances, dont la libération est déterminée par la concentration de calcium pré-synaptique, sont responsables de la transmission des messages nociceptifs périphériques vers les neurones spinaux : (1) *les acides aminés excitateurs* (neurotransmetteurs tels que le glutamate), (2) *les neuropeptides* (substance P, somatostatine, CGRP, cholécystokinine, neurokinine A...) qui jouent le rôle de neuromodulateurs.

(2.a) Neurones spinaux impliqués dans la douleur

D'après des études électrophysiologiques consacrées à la corne postérieure, on distingue deux catégories de neurones répondant à des stimuli nociceptifs : (1) *les neurones nociceptifs spécifiques* qui sont spécifiquement activés par les stimuli et sont localisés dans la couche I de la moelle. Ils ne sont activés que par les fibres A δ et/ou C. (2) *les neurones à convergence* qui ne répondent pas exclusivement à ces stimuli et sont localisés dans la couche V et dans les

couches plus superficielles. L'activité neuronale déclenchée est dépendante de la localisation et de la nature du stimulus sur leur champ récepteur cutané.

Une sensibilisation des mécanismes excitateurs ou un déficit des mécanismes inhibiteurs peut se traduire à la fois par une augmentation de la taille et l'activité de la population neuronale concernée par le foyer douloureux. Cette information est transmise de la moelle au cerveau où elle est décodée sous forme d'*hyperalgésie*. Celle-ci pourrait donc résulter d'une augmentation de la convergence des influx périphériques vers les neurones de la corne postérieure induite par l'hyperexcitabilité neuronale. Cette sensibilisation centrale épaulerait les mécanismes périphériques de recrutement supplémentaire de fibres adjacentes au foyer primaire. En outre, le déficit des mécanismes inhibiteurs pourra se traduire par le déclenchement d'une activité neuronale intense suite à l'application d'un stimulus anodin. Cette information est transmise de la moelle au cerveau où elle est décodée sous la forme d'*une allodynie*.

(2.b) Les faisceaux spinaux

La somesthésie offre un exemple de traitement parallèle de l'information sensorielle : une modalité est codée par une voie préférentielle, mais d'autres voies peuvent avoir des fonctions analogues. Dans le cas de la somesthésie, on décrit des voies empruntant deux systèmes ascendants principaux (**Figure 17**):

- *la voie lemniscale (ou voie des cordons postérieurs)*. Il s'agit d'un système très rapide de communication : l'information concernant la localisation sur le corps (somatotopie), l'intensité et la durée du stimulus atteint le cortex cérébral après deux relais seulement. Tout au long de ce système, l'organisation somatotopique est conservée de telle sorte que les informations précises concernant chaque région du corps sont envoyées vers une région corticale bien définie, chacune représentée sur l'*homunculus*. L'information est transmise vers le bulbe par le cordon postérieur homolatéral. Les cordons postérieurs sont principalement constitués par les branches ascendantes de fibres de gros diamètre, qui n'ont pas fait synapse au niveau médullaire. Au niveau du bulbe, les fibres font relais au niveau des noyaux de Goll (où transitent les informations issues du membre inférieur) et de Burdach (où transitent les informations issues du membre supérieur, cou et région occipitale). Après avoir décussés au niveau bulbaire, les neurones de ces noyaux envoient leurs axones vers le thalamus controlatéral, via le lémisque médian, puis le cortex pariétal.
- *la voie extra-lemniscate (ou voie antérolatérale)*. La formation réticulée bulbaire, le mésencéphale et le thalamus reçoivent la majorité des projections des neurones nociceptifs.

L'organisation de ces projections est bien différente de celle qui transmet les informations tactiles et proprioceptives via le système lemniscal. Elle concerne de nombreuses structures à tous les niveaux hiérarchiques du SNC, de telle sorte que c'est le cerveau dans son ensemble, du bulbe au cortex cérébral, qui est informé de la survenue d'évènements nociceptifs. On distingue trois principaux types de faisceaux :

- *Le faisceau spino-thalamique* où les neurones issus de la corne postérieure de la moelle se projettent sur le thalamus latéral et les neurones issus des couches VII et VIII de la corne antérieure se terminent dans les régions médianes du thalamus.
- *Le faisceau spino-réticulaire* où les mêmes régions de la substance grise médullaire donnent naissance à des neurones spino-réticulaires dont les axones se projettent également vers le quadrant antérolatéral de la moelle.
- *Le faisceau spino-mésencéphalique* projetant essentiellement sur deux structures du tronc cérébral : la substance grise périaqueducale (SPGA) et l'aire parabrachiale qui reçoit les informations de la couche I de la moelle.

Les informations transmises ont différentes finalités : perception, activation-éveil, contrôle moteur. L'organisation des voies somesthésiques ascendantes explique la distribution particulière des troubles sensitifs lors de la section d'une hémi-moelle : le toucher et la proprioception sont altérés du côté homolatéral, tandis que la douleur et la sensation de température sont altérées du côté contralatéral. En plus des voies décrites ci-dessous, il faut signaler des informations qui vont vers le cervelet mais ne donnent pas de perception consciente.

(3) Mécanismes centraux impliqués dans la douleur

(Pour revue, Le Bars et Adam, 2002; Le Bars et Willer, 2004)

Comme décrit précédemment, il existe une multitude de voies ascendantes susceptibles d'acheminer les messages nociceptifs vers le cerveau, le niveau le plus étudié étant le thalamus, relais majeur de toutes les informations sensorielles vers le cortex cérébral. Les messages nociceptifs atteignent le thalamus par voie directe (voies spino-thalamiques) ou indirecte (voies spino-réticulo-thalamiques). Mais il existe de nombreuses autres structures relais largement impliquées dans les processus de traitement de l'information nociceptive.

Il existe quatre grandes catégories de relais de la douleur au niveau cérébral :

- *Les relais réticulaires spécifiques* où le *subnucleus reticularis dorsalis* situé dans la partie caudale du bulbe pourrait avoir un rôle spécifique dans la douleur. Les neurones de ce noyau projettent : d'une part vers le thalamus médian et jouent donc le rôle d'intermédiaires des voies spino-réticulo-thalamiques, et d'autre part vers tous les

segments de la moelle et jouent donc également un rôle important dans les mécanismes de régulation spino-bulbo-spinaux.

- *Les relais bulbaires, pontiques et mésencéphaliques* où la structure majeure est l'aire parabrachiale latérale qui reçoit directement les informations issues des couches I de la corne postérieure de la moelle et possède de nombreux neurones nociceptifs projetant vers le noyau central de l'amygdale et l'hypothalamus (implication dans les processus végétatifs émotionnels et endocriniens liés à la douleur). Le tronc cérébral est ainsi le siège de systèmes nociceptifs et végétatifs suggérant l'apparement de la nociception à un système homéostatique plus vaste.

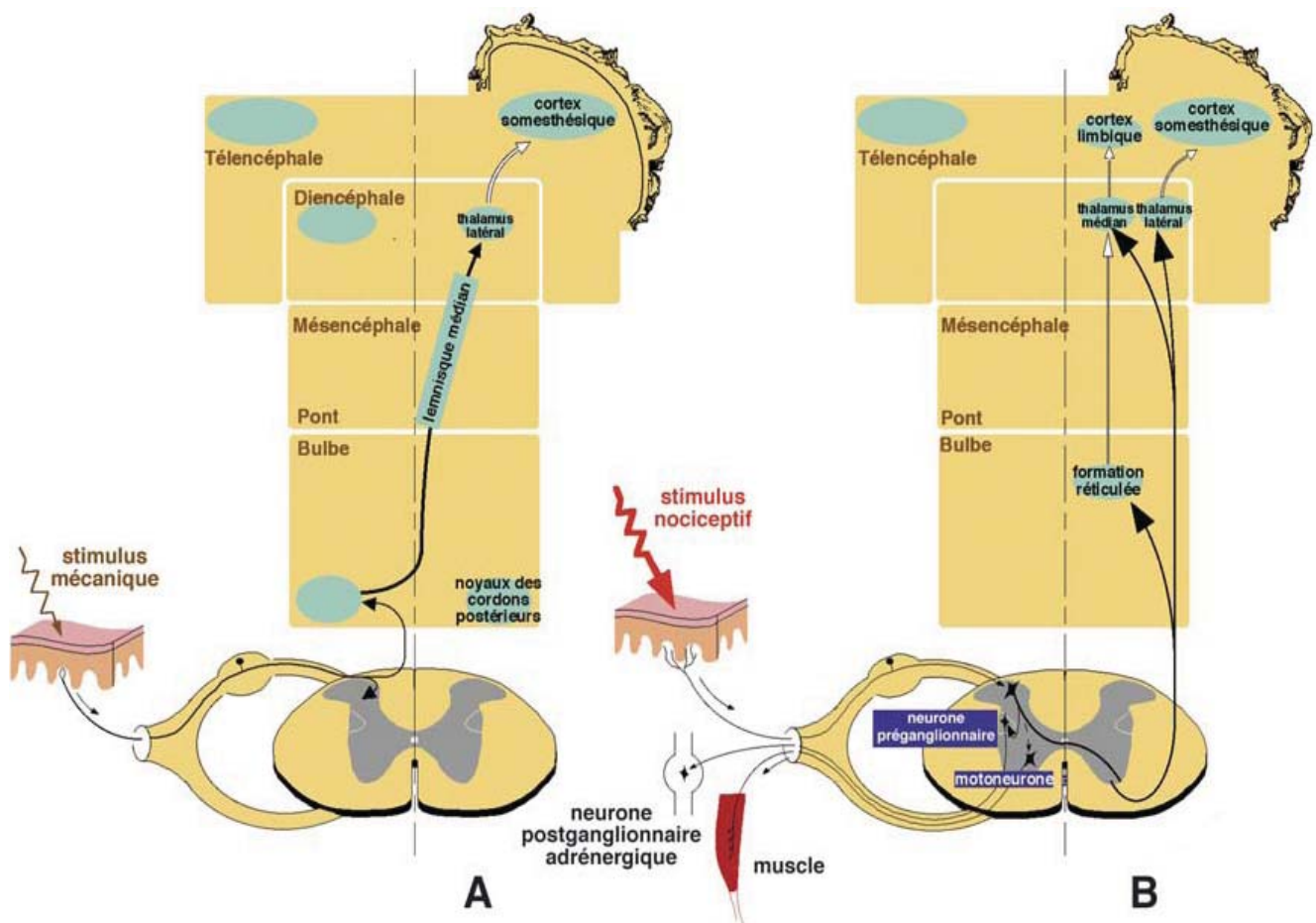


Figure 17. Voies somesthésiques ascendantes.

A. Système lemniscal. B. Système extralemniscal (voies spinoréticulaire et spinothalamique cheminant dans le quadrant antérolatéral). (D'après, Le Bars et Willer, 2004)

- *Les relais thalamiques* qui se divisent en deux types fonctionnellement différents : (1) les voies se terminant dans le thalamus latéral impliquées dans la composante sensorielle discriminative de la douleur. (2) les voies se terminant dans le thalamus médian potentiellement impliquées dans l'élaboration des réactions motrices et émotionnelles liées à la douleur du fait de leurs projections vers des aires corticales motrices, prémotrices et fronto-orbitaires.
- *Les relais corticaux* où les cortex somesthésiques primaire et secondaire sont activés par des stimulations nociceptives, mais dans une moindre mesure que les cortex cingulaire et insulaire. Il s'agit d'un ensemble d'aires cérébrales qui concourent probablement à l'élaboration de la perception de la douleur, du fait de leur lien avec le système limbique ayant un rôle primordial dans la genèse des émotions.

(4) Mécanismes de contrôle de la douleur

(Pour revue, Le Bars et Adam, 2002; Le Bars et Willer, 2004; Calvino et Grilo, 2006)

Bien qu'ils ne soient pas les seuls mécanismes de contrôle de l'information douloureuse, on distingue principalement trois grands mécanismes de contrôle de l'activité des neurones spinaux impliqués dans la nociception. La transmission spinale des messages nociceptifs est sous la dépendance d'influences excitatrices mais également d'influences inhibitrices. Ces phénomènes de modulation sont classés selon l'origine des mécanismes d'inhibition qui leur donnent naissance :

- *Les contrôles segmentaires spinaux.* Ils ont permis de mettre en évidence l'importance du rôle de la corne postérieure de la ME dans la modulation de la transmission des messages nociceptifs. Melzack et Wall (Melzack et Wall, 1965) ont modélisé les effets de l'influence de la corne postérieure dans leur théorie du «portillon» (**Figure 18**), qui a été précisée plus tard. Cette théorie repose sur une balance entre deux types d'activités exercées sur les neurones nociceptifs spinaux, à l'origine des faisceaux spinothalamiques et spinoréticulaires. On trouve des activités excitatrices d'origine segmentaire (fibres Aδ et C) et des activités inhibitrices d'origine à la fois segmentaire périphérique et supraspinale. L'organisation spatiale de la convergence des influences excitatrices et inhibitrices joue un rôle essentiel dans l'élaboration physiologique des messages issus de cette classe de neurones. On conçoit alors que des processus pathologiques soient capables de désorganiser complètement cet équilibre, notamment lorsqu'ils entraînent un déficit des contrôles inhibiteurs.

▪ *Les contrôles d'origine supraspinale.* Les contrôles inhibiteurs descendants sont exercés depuis le tronc cérébral, principalement à partir de deux structures à l'origine de voies descendantes dans la ME, l'une mésencéphalique, la SPGA et la région bulbaire rostroventrale (RBRV). La stimulation de ces régions du tronc cérébrale est capable d'inhiber la transmission spinale des messages nociceptifs par activation des voies inhibitrices descendantes en libérant la sérotonine et les opioïdes endogènes dans les couches superficielles de la corne postérieure. On distingue alors une boucle de rétroaction négative spino-bulbo-spinale sous tendant un système analgésique endogène mis en jeu par des stimulations nociceptives (**Figure 19**). Par ailleurs, on distingue également l'intervention d'un système inhibiteur descendant issu des locus coeruleus et subcoeruleus, impliquant la noradrénaline comme neurotransmetteur.

Des contrôles facilitateurs descendants, également issus du tronc cérébral, ont également été décrits, exacerbant les conséquences d'une stimulation nociceptive au niveau spinal. L'équilibre entre les deux systèmes descendants, l'un inhibiteur, l'autre facilitateur, déterminerait *in fine* le degré d'excitabilité du réseau de neurones dans la corne postérieure de la moelle et modulerait en retour la transmission de l'information douloureuse vers les structures nerveuses centrales supraspinales.

▪ *Les contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN)* déclenchés par des stimulations nociceptives sur une quelconque partie du corps, différente du champ périphérique excitateur des neurones à convergence de la corne postérieure, qui se trouvent alors fortement inhibés. Les CIDN sont sous-tendus par une boucle complexe faisant intervenir des structures supra-spinales.

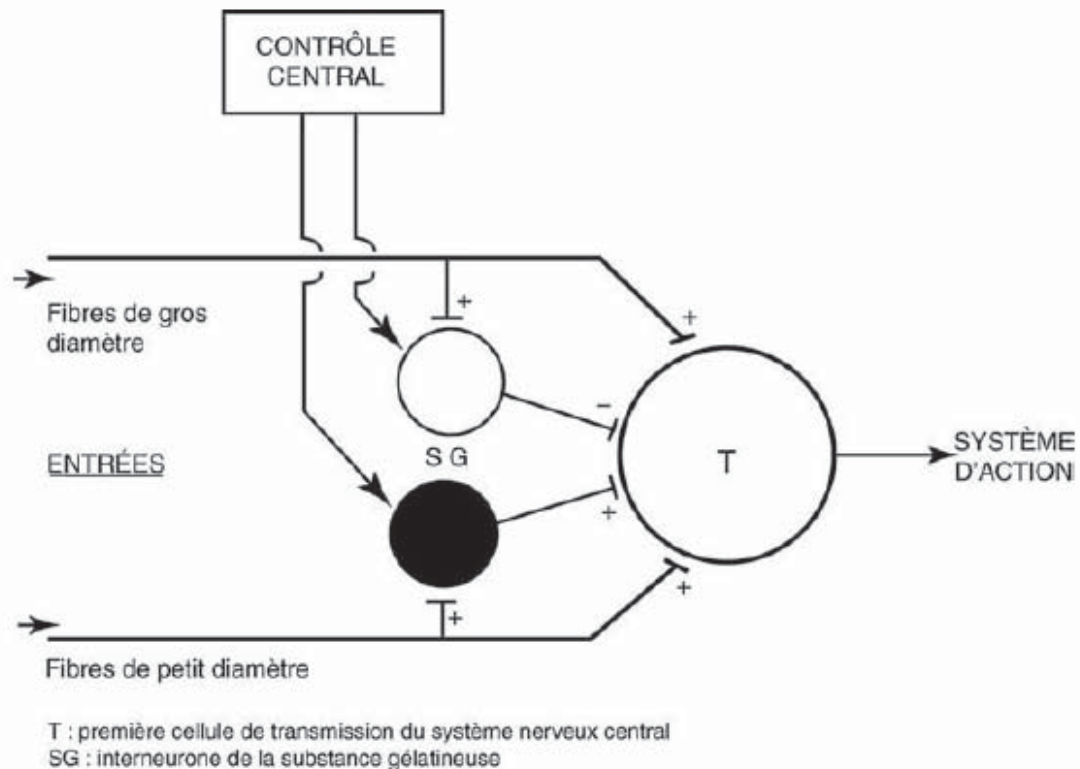


Figure 18. Schéma révisé de la « théorie du portillon ».

Deux familles d'interneurones, excitatrices et inhibitrices, sont mises en jeu dans le système de contrôle. (D'après, Calvino et Grilo, 2006)

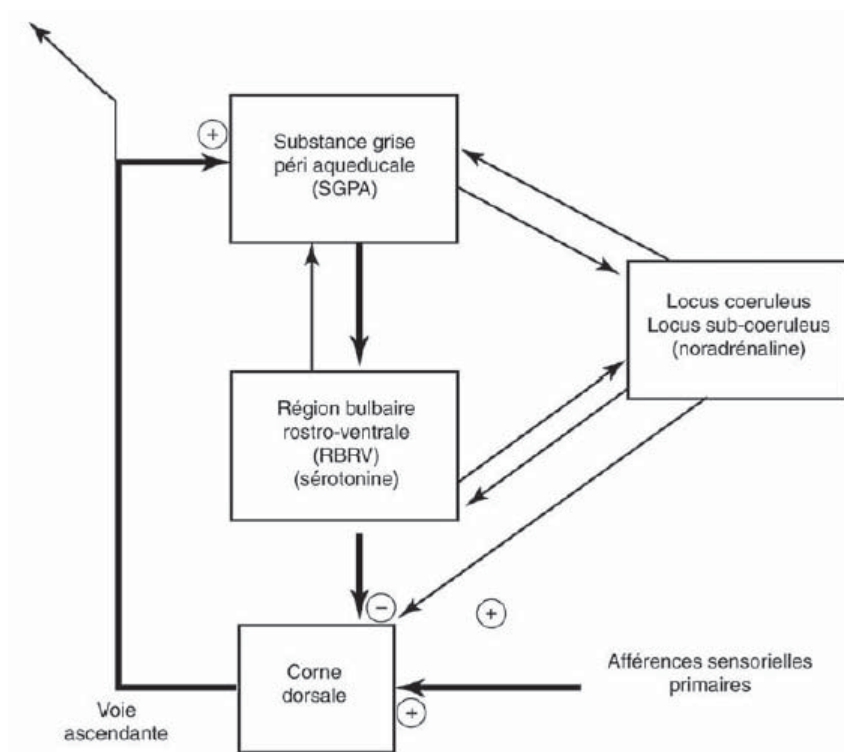


Figure 19. Boucle de rétroaction négative spinobulbospinale sous-tendant un système analgésique endogène mis en jeu par des stimulations nociceptives.

(D'après, Calvino et Grilo, 2006)

(5) Les syndromes douloureux

La douleur est définie par l'IASP (International Association for the Study of Pain) comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en termes d'une telle lésion ». La douleur est un phénomène perceptif, neurophysiologique, qui comporte des composantes sensorielle, affective et cognitive. Lorsqu'elle est étudiée chez le rongeur, c'est principalement la composante sensorielle qui est prise en compte.

Le terme *nociception* a été introduit par Sherrington pour désigner le système physiologique qui permet de détecter les stimulations susceptibles de menacer l'intégrité de l'organisme. On qualifie de nociceptives ces stimulations ainsi que les réponses. La finalité biologique de la nociception est celle d'un signal d'alarme utile qui détermine un ensemble de réflexes et de comportements protecteurs (réflexe de retrait, immobilisation de la région lésée, comportement d'évitement). Les notions de nociception et de douleur ne sont pas superposables, la douleur n'étant pas un stimulus. Des lésions tissulaires peuvent intervenir sans perception de douleur et, à l'inverse, certaines douleurs peuvent survenir en l'absence de cause nociceptive identifiée (douleurs d'origine neuropathique ou psychologique).

Une caractéristique essentielle de la douleur est d'être modifiable par de nombreux facteurs : physiques, psychologiques ou pharmacologiques. Ces variations peuvent se concevoir du fait de l'importance des contrôles, excitateurs et inhibiteurs, s'exerçant sur la transmission des messages nociceptifs.

Sur la base des mécanismes physiopathologiques, on peut distinguer trois grands types de syndromes douloureux. Ce sont des états différents de fonctionnement du système nociceptif qui sont à l'origine de ces différents types de douleur.

(5.a) La douleur « physiologique »

Il s'agit d'un contexte dit normal où la douleur est perçue en réponse à des stimulations brèves susceptibles d'induire une lésion tissulaire et se caractérise par une relation simple et positive entre l'intensité du stimulus et l'ampleur des réponses. Selon l'expérience passée et le contexte immédiat, ces réponses peuvent être modulées, soit dans le sens d'une facilitation, soit dans le sens d'une inhibition.

Des stimulations nociceptives induisent des réflexes appelés *réflexes extéroceptifs* (ou réflexes nociceptifs de retrait) qui comprennent toutes les activités motrices déclenchées par des messages afférents d'origine cutanée relayés dans la moelle. Ces réflexes sont une réaction de protection de l'organisme vis-à-vis d'un stimulus potentiellement dangereux pour

son intégrité. Le mouvement réflexe résulte de la contraction (activation) d'un ensemble de muscles fléchisseurs et du relâchement (inhibition) d'un ensemble de muscles extenseurs.

(5.b) La douleur « inflammatoire »

Dans le cas de lésions provoquées par un stimulus nocif, il se produit des transformations tissulaires prolongées de type inflammatoire. Ici, la relation entre la stimulation et les réponses évoquées change profondément :

- La douleur peut devenir spontanée.
- Le seuil de douleur peut être abaissé dans la région lésée et un stimulus douloureux est perçu plus intensément (hyperalgésie). Les nocicepteurs polymodaux sont très sensibles au phénomène de *sensibilisation*. Leur seuil d'activation se trouve abaissé après répétition d'un stimulus nociceptif, et leur fréquence de décharge augmentée pour un stimulus d'intensité donnée. Les modalités de leur activation peuvent également évoluer ; c'est ainsi qu'un mécano-nocicepteur peut devenir sensible à des stimuli thermiques répétés. Ces processus sont amplifiés au cours de l'inflammation.
- La douleur peut se prolonger au-delà de l'application du stimulus.
- Un stimulus léger, normalement indolore, peut devenir douloureux (allodynie).
- L'hypersensibilité peut s'étendre au-delà de la région lésée (hyperalgésie secondaire). Si un stimulus nociceptif déclenche une sensation douloureuse, la lésion tissulaire résultante sera responsable d'une série d'événements étroitement liés aux processus inflammatoires, qui vont prolonger l'activation des nocicepteurs et induire une sensibilisation. Certains nocicepteurs, appelés *nocicepteurs silencieux*, ne sont d'ailleurs actifs que dans des conditions d'inflammation tissulaire.

La finalité biologique de ces changements est de favoriser la guérison en ajustant les réactions et les comportements.

(5.c) La douleur « neuropathique »

(Pour revue, Baron, 2006)

Il s'agit de la douleur résultant d'une lésion ou d'une transformation pathologique du système somesthésique. En plus des symptômes retrouvés dans les douleurs inflammatoires, on note des douleurs spontanées continues (brûlures, torsions, sensations de décharges électriques), des douleurs dans une région insensible (« anesthésie douloureuse ») ou encore des douleurs dans un membre fantôme, des paresthésies (fourmillements, picotements...) et des dysesthésies (sensations désagréables mais non douloureuses). Ces douleurs persistantes n'ont pas de finalité biologique et sont difficiles à traiter.

La douleur neuropathique est induite par des lésions du SNP (diabète, maladie de Charcot-Mari-Tooth) ou du SNC (accident vasculaire cérébrale, sclérose en plaques...). Dans ce dernier cas, on adopte le terme de « douleur neuropathique centrale ». Les douleurs sont souvent attribuées à un dysfonctionnement des mécanismes de contrôle de la transmission de l'information nociceptive. Elles sont consécutives à des lésions du système nerveux qui intéressent les systèmes nociceptifs eux-mêmes et témoignent donc d'une véritable pathologie de la nociception. La douleur survient au niveau du territoire d'innervation de la lésion et est associée à un déficit parfois important de la sensibilité aux stimulations tactiles ou thermiques. Ainsi un des paradoxes des lésions nerveuses est qu'elles peuvent se manifester par la combinaison de symptômes positifs (douleurs, dysesthésies...) et d'un déficit sensitif qui peut être partiel ou complet, avec ou sans phénomène d'allodynie ou d'hyperalgésie (Bouhassira, 2008). Dans un contexte de neuropathie périphérique, les fibres afférentes normalement dévolues aux sensations tactiles peuvent acquérir certaines propriétés de fibres nociceptives de fin calibre, dont la capacité d'évoquer des sensations douloureuses.

Il existe deux types de mécanismes physiopathologiques induisant une douleur neuropathique :

- La *sensibilisation périphérique*: après une lésion du nerf périphérique, les neurones afférents primaires deviennent anormalement sensibles et développent une activité spontanée pathologique. Ces changements pathologiques sont soutenus par des changements moléculaires et cellulaires importants au niveau du nocicepteur afférent primaire. Cette activité spontanée s'accompagne par une augmentation d'ARN messagers pour les canaux sodium voltage-dépendants dans les neurones afférents, responsable de la diminution du seuil de déclenchement des potentiels d'action et donc de l'hyperactivité conséquente, pas seulement au niveau de la lésion mais également au niveau des ganglions des racines dorsales (DRG). Les dommages des nerfs périphériques induisent également une surexpression de certains récepteurs à la membrane des afférences primaires, notamment les récepteurs TRPV1 (activé pour des températures supérieures à 43°C), TRPV4 (activé pour des températures supérieures à 30°C), TRPM8 (activé entre 8-28°C) ou les canaux ASICs. Plusieurs données appuient l'idée d'une sensibilité adrénergique, suite à l'expression de récepteurs $\alpha 1$ - et $\alpha 2$ -adrénergiques fonctionnels sur les fibres afférentes cutanées. La lésion du nerf induit également une activation des macrophages qui s'infiltrant dans le nerf et les DRG, libérant des cytokines pro-inflammatoires, notamment TNF- α .

- La *sensibilisation centrale* : Conséquence de l'hyperactivité des nerfs périphériques, des changements secondaires drastiques surviennent dans la corne dorsale de la ME, notamment une augmentation de l'excitabilité des neurones. Cette hyperexcitabilité se manifeste par une

augmentation de l'activité neuronale en réponse à des stimuli nocifs, une étendue des champs de récepteurs neuronaux et une propagation de l'hyperexcitabilité à d'autres zones. C'est l'activité au niveau des fibres C sensibilisées qui permet l'initiation et le maintien de cette sensibilisation centrale. Ces fibres sensibilisent la corne dorsale de la moelle en libérant du glutamate, qui agit sur les récepteurs post-synaptiques NMDA, et le neuropeptide substance P. Cette libération est facilitée par la surexpression, suite à des lésions du nerf périphérique, de canaux calcium voltage dépendants au niveau des sites pré-synaptiques sur les terminaisons des nocicepteurs afférents.

Le mécanisme de sensibilisation centrale est également fortement augmenté par la perte, au niveau de la corne dorsale, du contrôle inhibiteur exercé par les interneurons libérant le GABA.

Il a également été suggéré que la perte de fonction des contrôles inhibiteurs descendants sérotoninergiques et noradrénergiques contribuerait à la sensibilisation centrale et la chronicité de la douleur.

(6) Implication des cellules gliales dans la douleur

(Pour revue, McMahon et Malcangio, 2009; Bradesi, 2010; Zhuo et al., 2011)

Il est depuis longtemps reconnu que des cellules non-neuronales peuvent jouer un rôle important dans l'initiation et la modulation de l'activité des nocicepteurs en libérant des médiateurs qui se lient à des récepteurs spécifiques exprimés par ces nocicepteurs. Des sources particulièrement importantes de médiateurs sont les cellules du système immunitaire, qui sont recrutées aux sites de lésion périphérique et d'inflammation. Cependant il existe une autre forme de modulation de la douleur provenant de cellules non-neuronales, et particulièrement l'implication, dans les processus douloureux, des cellules gliales du SNC (qui incluent certaines cellules du système immunitaire comme la microglie, mais également d'autres cellules comme les astrocytes et les OLs).

Pendant longtemps, l'intérêt des cellules gliales s'est porté sur leur rôle présumé de support pour les neurones, notamment l'implication dans l'homéostasie métabolique du SNC, l'isolation électrique pour l'intégrité et la transmission des signaux et une surveillance immunitaire dans le cas de la microglie. Mais un nouveau rôle de ces cellules apparaît dans les processus douloureux, avec une implication dans la régulation de la fonction neuronale. Ainsi, la glie centrale, dans certaines circonstances pourrait contribuer de façon importante au comportement douloureux. Les arguments de cette implication reposent sur le fait que les cellules gliales du SNC sont, dans des conditions normales, spectateurs des processus nociceptifs, mais que, suite à des dommages des tissus ou nerfs périphériques, elles

« s'activent », libèrent des facteurs pro-inflammatoires induisant une hyperexcitabilité dans les voies de la douleur et contribuent ainsi à une perception douloureuse anormale. Les médiateurs pro-inflammatoires libérés par la glie, incluant les cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6), les chimiokines et des neuromodulateurs (ATP, NO), peuvent agir sur les fonctions neuronales mais également sur les cellules gliales elles-mêmes. Ces interactions réciproques entre la glie et les neurones pourraient contribuer à l'activation d'une boucle d'amplification neuro-gliale menant à l'amplification des signaux de douleur (Watkins et al., 2003).

Suite à des lésions du SNC, la microglie répond rapidement en entrant dans un cycle cellulaire et se développant localement. Ce type de microgliose réactive est une caractéristique des pathologies du SNC, comme les accidents vasculaires cérébraux, les maladies neurodégénératives et les pathologies inflammatoires démyélinisantes. L'activation astrocytaire joue, quant à elle, un rôle critique dans le contrôle des concentrations de glutamate extracellulaire et les communications intracellulaires, particulièrement au niveau de lésions (Rossi et al., 2007). Il apparaît que le nombre de cellules microgliales et astrocytaires augmente de façon importante dans des modèles expérimentaux de douleur, particulièrement ceux impliquant des lésions du nerf périphérique (Echeverry et al., 2008). La dégénérescence axonale apparaît comme un pré-requis à la prolifération astrocytaire aux sites de lésions du SNC, mais au contraire, après lésion du nerf périphérique, la prolifération microgliale dans la corne dorsale de la ME peut survenir en absence de dégénérescence axonale (Liu et al., 2000) ou de mort neuronale (Polgár et al., 2005). Dans des modèles de douleur neuropathique impliquant des lésions traumatiques des nerfs périphériques, dans des neuropathies induites par chimiothérapie et dans des modèles de neuropathie diabétique, il a été confirmé que les cellules microgliales et astrocytaires de la ME adoptent des états activés (leurs changements morphologiques sont identifiés par des marqueurs qui sont respectivement Iba1 et GFAP) de façon concomitante à l'apparition d'hyperalgésie et d'allodynie (Wodarski et al., 2009). En accord avec l'idée selon laquelle les cellules gliales jouent un rôle dans les douleurs neuropathiques, les inhibiteurs gliaux peuvent prévenir les réponses douloureuses dans ces modèles de douleur.

Dans les modèles de douleur inflammatoire induites par des dommages ou inflammation des tissus périphériques, l'hypersensibilité est observée au site de lésion et aux tissus environnant mais ne persiste pas quand l'inflammation prend fin. Le rôle de l'activation gliale dans la douleur inflammatoire s'appuie sur les études de modèles d'arthrite (Cao et Zhang, 2008) montrant une activation astrocytaire et microgliale spinale, mais des données contradictoires dans leur profil temporel d'activation laissent supposer que leur implication dans les

processus inflammatoires n'est pas encore bien définie (Hains et Waxman, 2006; Cao et Zhang, 2008).

(7) Explorations fonctionnelles

L'étude des bases neurophysiologiques de la douleur, avec ses systèmes de transmission et de contrôle, aide à mieux comprendre les mécanismes sous-tendant l'apparition de la douleur.

Il existe diverses méthodes d'analyse électrophysiologiques:

- La *vitesse de conduction nerveuse (VCN)*, qui consiste à enregistrer en un point du nerf sensitif, l'ensemble des potentiels d'action provoqués par une stimulation appliquée au niveau d'un autre point. La réponse obtenue est de faible amplitude mais peut s'observer après une stimulation unique. A partir du point de stimulation, l'influx nerveux se propage dans deux sens, orthodromique (sens de l'influx sensitif) et antidromique. Dans les conditions pathologiques, on peut noter une diminution de l'amplitude de la réponse (atteinte axonale) et/ou un ralentissement de la vitesse de conduction témoignant d'une démyélinisation.
- Les *potentiels évoqués somesthésiques (PES)*, qui consistent à explorer l'ensemble des voies somesthésiques en stimulant un nerf périphérique (médian, sciatique) et en enregistrant le potentiel évoqué via des électrodes cutanées au niveau des différents relais de la voie somesthésique. L'amplitude des réponses trop faible après une unique stimulation nécessite plusieurs répétitions dont on fait ensuite la moyenne.
- L'*électro-neuro-myographie (ENMG)*, qui consiste à faire un enregistrement électrique de l'activité musculaire afin de diagnostiquer des pathologies neuromusculaires s'accompagnant d'atteintes du muscle et des nerfs périphériques. Les muscles sont stimulés par des signaux provenant des neurones moteurs, provoquant une activité électrique qui induit en retour une contraction du muscle enregistrée par une électrode (onde M). En parallèle, on peut enregistrer par cette même électrode, une réponse de type sensitive (onde H ou S). Bien que l'EMG teste principalement le système moteur, il est particulièrement utile pour identifier des anomalies des nerfs ou des racines des nerfs spinaux qui peuvent être associées à des syndromes douloureux. Les résultats de l'EMG peuvent aider à distinguer si les symptômes sont dus à une pathologie musculaire ou à des désordres neurologiques.

3. La fonction cognitive

a. La mémoire

(Pour revue, Deschamps et al., 2011; Lavallard-Rousseau, 2011)

La définition traditionnelle de la mémoire est simple : c'est la fonction qui permet et assure l'enregistrement de nouvelles informations, leur stockage et leur restitution. Elle exclut les apprentissages fondamentaux du développement normal de l'individu : marche, langage, connaissance et manipulation minimale du monde.

L'exploration des processus mnésiques s'est faite selon trois principales voies de recherche :

- la psychologie expérimentale humaine, initiée par H. Ebbinghaus, philosophe allemand, qui mesura scientifiquement ses propres capacités de mémorisation en s'astreignant pendant sept ans à retenir des syllabes sans signification avec rappel après des délais variables allant de 1 heure à 1 mois. De ces travaux publiés en 1885, plusieurs hypothèses ont depuis été confirmées : l'oubli est d'abord rapide au cours des premières heures puis plus lent avec le temps, les performances s'améliorent avec la répétition et la possibilité d'interférence entre listes apprises.
- l'étude de patients, des travaux de T. Ribot à ceux de A. Damasio en passant par ceux de S. Korsakoff, ou encore S. Freud ; les exemples sont nombreux, et se sont encore multipliés grâce à l'apport de la neuro-imagerie. Le cas le plus célèbre de patient cérébro-lésé est celui du patient H.M., dont nous reparlerons ultérieurement.
- l'expérimentation animale, qui a débuté conjointement avec les travaux de I.P. Pavlov dès 1889 sur l'apprentissage associatif ou le conditionnement classique et ceux de E. Thorndike, en 1898, sur le conditionnement opérant avec apprentissages et système de récompense ou de punition. Cette approche a notamment permis de mieux apprécier le rôle des différentes régions du cerveau dans les processus mnésiques ainsi que les modifications moléculaires mises en œuvre.

(1) Les différents types de mémoire

La mémoire n'est pas unique, mais il existe plusieurs systèmes de mémoire interdépendants, chacun pouvant être subdivisé en plusieurs sous-systèmes. En fonction du type de mémoire utilisé, ce sont différentes régions du cerveau qui interviennent.

Il existe différentes mémoires selon la durée du souvenir (**Tableau 1**):

- la mémoire sensorielle
- la mémoire à court terme
- la mémoire à long terme

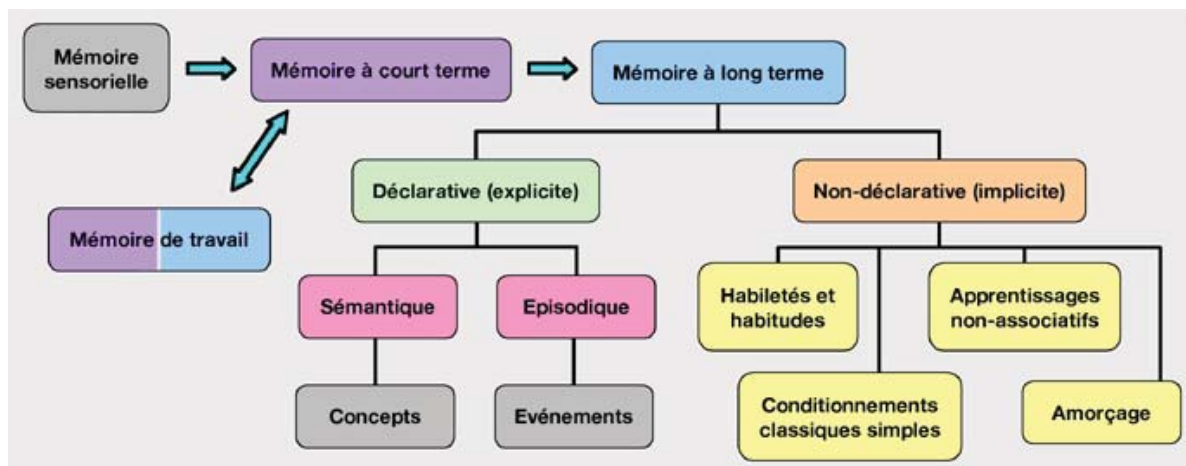


Tableau 1. Représentation schématique des différents types de mémoire.

(1.a) La mémoire sensorielle

Il s'agit d'une mémoire très brève qui prolonge pendant environ 300 ms une information sensorielle, visuelle (mémoire iconique) ou auditive (mémoire échoïque).

(1.b) La mémoire à court terme

Il s'agit d'une mémoire de capacité limitée permettant l'analyse d'une information sensorielle au niveau d'aires cérébrales spécialisées et sa restitution après 1 à 2 minutes. Sa capacité est également limitée en quantité, permettant d'enregistrer sept éléments environ, on parle « *d'empan mnésique* ». Elle permet par exemple de retenir un numéro de téléphone donné oralement, le temps de le composer ou de l'écrire. Cependant, la mémoire à court terme n'est pas un simple système d'enregistrement et de rappel passif, c'est un processus dynamique, capable d'un traitement de l'information avant sa restitution. A. Baddeley a remplacé le concept de mémoire à court terme par celui de *mémoire de travail*, introduisant la notion d'attention et postulant l'existence de différents sous-systèmes. Les informations retenues temporairement, voire analysées grâce à la mémoire à court terme/mémoire de travail, sont ensuite soit effacées, soit stockées dans un autre système, la mémoire à long terme.

(1.c) La mémoire à long terme

Elle intervient lorsque l'on souhaite retenir plus longtemps une information. Elle implique le transfert des informations initialement acquises à une forme de stockage plus durable, stable

et définitive qui constitue « *l'engramme* », nom sous lequel on désigne le substrat physique de la mémoire dans les circuits neuronaux. Comme l'ont montré les études des patients présentant une lésion cérébrale, la mémoire à long terme n'est pas une mémoire unique, et on distingue, en fonction de son contenu, plusieurs subdivisions. Contrairement à la mémoire à court terme, cette mémoire a une capacité quasi illimitée en quantité et dans le temps.

E. Tulving est ainsi à l'origine de la distinction entre mémoire épisodique et mémoire sémantique. La *mémoire épisodique* fait référence au souvenir conscient d'expériences passées, spécifiées dans le temps et dans l'espace. Elle est subdivisée en mémoire biographique faisant référence aux souvenirs anciens de nature autobiographique, et en mémoire prospective, de nature intentionnelle, permettant la mémorisation d'actions à entreprendre dans le futur. La *mémoire sémantique* se rapporte aux concepts qui font la connaissance générale du monde, tels que les règles grammaticales, le sens des mots, les noms de capitales. Contrairement à la mémoire épisodique, son évocation n'est pas associée au rappel du contexte de son apprentissage (Seattle se trouve aux Etats-Unis, mais je ne sais pas quand et où j'ai acquis cette connaissance), et est peu sensible à l'affectivité.

Cohen et Squire ont proposé un second type d'organisation de la mémoire à long terme, qui oppose une *mémoire déclarative*, intégrant les mémoires épisodique et sémantique, car toutes deux sont accessibles à la conscience et verbalisables, à une *mémoire non déclarative ou procédurale* (Cohen et Squire, 1980). Cette dernière, inconsciente et peu flexible, concerne les capacités ou habiletés perceptives et motrices (faire du vélo, jouer du violon ...), ainsi que des formes élémentaires d'apprentissage comme l'habitation et le conditionnement. Il existe une autre différence entre ces deux processus : les souvenirs de la mémoire déclarative se forment souvent facilement alors que les souvenirs de la mémoire procédurale se forment après un temps d'apprentissage et de nombreuses répétitions et sont donc moins susceptibles de disparaître.

D. Schacter et P. Graf ont proposé de distinguer *mémoire explicite* qui se réfère à la récupération consciente, intentionnelle, de la *mémoire implicite* à la récupération inconsciente, non intentionnelle (Graf et Schacter, 1985). Certains considèrent que la mémoire explicite est une propriété de la mémoire déclarative, alors que la mémoire implicite est une caractéristique de la mémoire procédurale.

Enfin, W. Schneider et R.M. Shiffrin ont proposé d'opposer une *mémoire dite contrôlée*, demandant un effort d'attention, et ne traitant qu'une information à la fois, à une *mémoire automatique*, ne demandant, elle, que peu d'effort, capable de traiter plusieurs informations, non contrôlable par le sujet (Shiffrin et Schneider, 1984). La première est utile pour des

situations inédites, alors que la seconde permet la réalisation de tâches habituelles et prévisibles.

Cependant, la dichotomie mémoire à court/long terme n'est pas aussi nette et la mémoire à court terme est maintenant considérée par de nombreux auteurs comme une partie de la mémoire à long terme et il s'agit en fait d'une sous-unité qui se trouve à un instant donné en état d'« activation ». Il faut ainsi distinguer « un système de mémoire dont la fonction est de maintenir à un certain niveau d'évocation des informations pendant un temps restreint (mémoires transitoires), d'un système dont le but est d'organiser et de stocker ces informations pour les utiliser ultérieurement (la mémoire permanente) (Seron et al., 1994).

(2) Processus d'acquisition et de restitution

L'élaboration et l'emploi d'une trace mnésique permanente supposent trois temps :

- *L'encodage* - L'enregistrement d'une information sensorielle nécessite tout d'abord que celle-ci soit transformée sous une forme plus ou moins élaborée pour être mise en mémoire, c'est l'encodage. La qualité de l'encodage initial conditionne directement la qualité du rappel, Plus l'encodage est profond, plus la trace mnésique est forte et durable et plus la récupération sera facilitée. Cet encodage ne peut nécessiter aucun effort conscient mis en jeu (processus automatique) ou au contraire exiger un effort conscient et limitant la capacité de réalisation simultanée d'autres tâches.
- *Le stockage* – Il implique des processus de consolidation, grâce à des mécanismes de réactivation (répétition) et de réorganisation. Dans un premier temps Le stockage constitue un apprentissage rapide des informations d'un épisode ; ces informations sont alors vulnérables à l'oubli. Certaines informations vont être progressivement consolidées par la réactivation (répétition) des traces mnésiques de l'épisode, permettant leur stockage à long terme. Les nouveaux épisodes sont stockés en lien avec les anciens souvenirs similaires, qui sont alors réorganisés et consolidés.
- *La récupération* – Elle se réfère au processus qui permet à une information d'être extraite de la mémoire à long terme. Cette troisième étape permet en théorie de se souvenir d'événements qui étaient en attente dans le cerveau. La récupération doit rechercher tous les sous-ensembles du souvenir pour pouvoir le restituer dans sa globalité. Les informations ayant été encodées au sein de représentations qui incluent le contexte dans lequel l'information a été encodée, les informations contextuelles font partie intégrante de la trace mnésique et constituent des indices de récupération. Ces indices facilitent la recherche et l'accès à l'information cible stockée en mémoire à long terme.

A ces trois étapes de la création de la trace mnésique, il faut ajouter l'oubli qui est encore un mécanisme mal connu mais qui permet au cerveau de se délester d'informations à chaque étape du processus de stockage mnésique.

(3) Les structures cérébrales impliquées ou systèmes de mémoire

(Pour revue, Gisquet-Verrier, 2006; Manns et Eichenbaum, 2008)

La question principale concernant les structures impliquées dans les processus de mémorisation est : la mémoire est-elle localisée dans une structure particulière ou bien est-elle distribuée à travers tout le cerveau ? Alors que les travaux du psychologue Karl Lashley, dans les années 1920, suggèrent que la mémoire est distribuée à travers tout le cerveau, ceux du neurochirurgien Wilder Penfield suggèrent que certaines régions, et notamment le lobe temporal médian, sont indispensables pour la mémorisation. Le psychologue Donald Hebb offrit une réconciliation pour ces deux hypothèses en suggérant que les pensées et les souvenirs sont supportés par des assemblées de cellules ou des réseaux neuronaux, et que les apprentissages résultent en des changements dans ces connexions entre les cellules (Hebb, 1949). Ainsi certaines structures anatomiques sont clairement impliquées dans les processus de mémorisation, cependant ce processus est dynamique, en boucle et peut nécessiter la connexion entre plusieurs structures ou circuits. Par ailleurs, les structures anatomiques qui supportent la mémoire n'exercent pas uniquement cette activité.

(3.a) Le cas particulier du patient HM

Un grand nombre d'avancées sur les connaissances des structures cérébrales impliquées dans la mémoire proviennent de la description du patient probablement le plus célèbre de l'histoire des neurosciences : *le patient HM* (Scoville et Milner, 1957). Ce patient présentant une épilepsie très sévère et résistante aux médicaments depuis l'âge de 10 ans a subi le 1^{er} septembre 1953 une exérèse bilatérale importante du lobe temporal médian. Si cette opération a eu une grande efficacité sur l'épilepsie, avec une diminution importante de la fréquence et de la sévérité des crises, elle a eu des conséquences tragiques sur les fonctions neuropsychologiques du patient. En effet, le patient HM présentait des troubles importants de la mémoire, étant incapable de donner sa date de naissance et ne se rappelant pas clairement avoir subi un acte neurochirurgical. La sévérité de l'amnésie de HM était impressionnante puisque le patient était quasiment incapable d'apprendre de nouvelles connaissances.

En plus d'impliquer le lobe temporal médian dans les formes explicites ou épisodiques d'apprentissage et de mémoire, l'analyse des fonctions préservées chez le patient HM a également permis d'accroître notre compréhension sur la mémoire. Tout d'abord, les tests neuropsychologiques ont montré que les capacités cognitives autres que la mémoire, telles que la perception, la pensée abstraite, le raisonnement ou le score de QI, étaient intactes chez le patient HM ; suggérant que perception et intelligence peuvent être distinguées de la mémoire. De plus, le patient HM pouvait retenir une petite quantité d'informations aussi longtemps qu'elles étaient activement répétées suggérant une dissociation entre mémoire de travail et mémoire implicite. Les souvenirs d'enfance de HM étaient également relativement intacts suggérant que bien que le lobe temporal médian soit important pour la formation de nouveaux souvenirs, cette région n'est probablement pas impliquée dans le stockage à très long terme de la mémoire. Enfin, HM avait une capacité intacte pour acquérir de nouvelles habiletés motrices suggérant que le lobe temporal médian n'est pas le siège de la mémoire implicite.

(3.b) Le circuit hippocampique

La description par Papez en 1937 d'un circuit reliant entre eux l'hippocampe, le corps mamillaire, le thalamus et le cortex cingulaire, marque une date importante, bien que sa fonction mnésique n'ait été reconnue que plus tard, lors de la description du patient HM en 1957.

Le *circuit de Papez* est une boucle hippocampo-hippocampique passant par les piliers du trigone, le corps mamillaire, le faisceau mamillo-thalamique, le noyau antérieur du thalamus, le gyrus cingulaire et le cingulum (**Figure 20**).

Les afférences principales de l'hippocampe sont représentées par :

- les fibres perforantes issues du cortex entorhinal sur lequel projettent le néocortex, le cortex parahippocampique postérieur, le cortex prépiriforme et l'amygdale. Ces fibres rejoignent la cupule des cellules granulaires du gyrus denté dont les axones vont faire synapse avec les cellules du champ CA3 de la corne d'Ammon.
- les fibres alvaires issues du cortex cingulaire se projetant sur le subiculum.
- des fibres controlatérales provenant du septum, de l'hippocampe et du cortex entorhinal controlatéral via le trigone (commissure postérieure) se projettent sur l'hippocampe à contrecourant.

Les origines de ces afférences sont le cortex limbique, la circonvolution parahippocampique et le gyrus cingulaire. Ce sont des aires d'association et de transit où la conduction vers l'hippocampe se fait à la fois dans le cortex et dans le cingulum et le plus souvent à double sens.

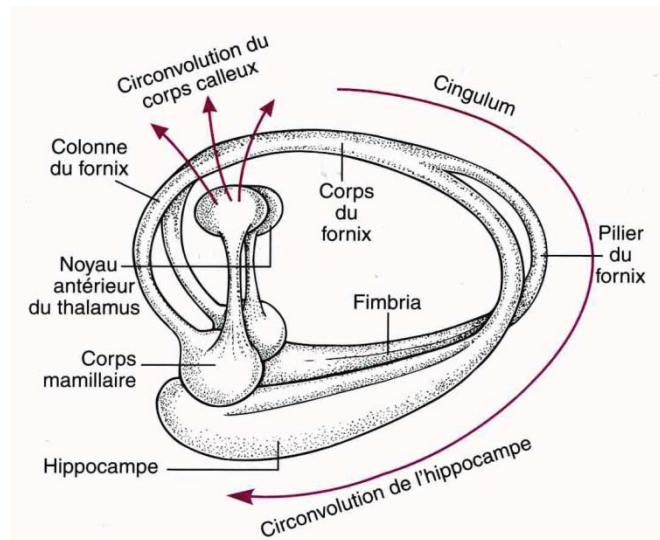


Figure 20. Interconnexions des structures limbiques constituant le circuit de Papez.

(D'après, Lavallard-Rousseau, 2011)

Les voies efférentes de l'hippocampe sont de deux types : celles qui rejoignent les piliers du fornix et celles qui se dirigent vers le néocortex associatif. Le fornix, ou trigone, véhicule la grande majorité des efférences de l'hippocampe en participant à la voie hippocampo-mamillaire mais aussi hippocampo-septale.

Dans une troisième étape, le circuit se projette de façon rayonnante sur le gyrus cingulaire d'où partent les fibres qui rejoignent l'hippocampe. Les radiations thalamocingulaires rejoignent le cingulum, qui retourne en partie au pied de l'hippocampe après être rentré en contact avec le cortex, le cortex cingulaire, le diencephale, le mésencéphale et la rétículo.

Le circuit de Papez n'est pas un circuit fermé. Il s'ouvre sur le néocortex et les structures sous-corticales, car le gyrus parahippocampique, le gyrus cingulaire et le cortex rétrospénial échangent des connexions réciproques avec les cortex associatifs pariétaux et temporaux. De plus, les noyaux thalamiques (pulvinar en particulier) participent également aux relations entre système limbique et néocortex. Le circuit de Papez est également accompagné d'un circuit limbique mésencéphalique avec le faisceau mamillo-tegmental.

Enfin, la jonction septo-hippocampique et hippocampo-septale est de grande importance et ses connexions avec le tronc cérébral, l'hypothalamus et le cortex sont, pour la plupart, à double sens. L'anatomie et les circuits de ces régions sont très conservés entre les espèces (Manns et Eichenbaum, 2007) (**Figure 21**). Ainsi les données de lésions obtenues chez le rongeur corroborent les hypothèses émises chez l'Homme.

Le système de mémoire hippocampique dépend donc des ordres de régions corticales diverses et variées qui constituent à la fois la source des informations pour la région parahippocampique et l'hippocampe ainsi que la cible des projections de ces régions. La région parahippocampique sert de site de convergence pour les entrées des informations corticales et distribue ces informations aux différentes subdivisions de l'hippocampe. A l'intérieur de l'hippocampe, un réseau intriqué de connectivités constitue un large réseau d'associations, et ces connexions sont le support des mécanismes moléculaires participant au codage rapide des nouvelles informations (*cf. Chapitre I. C. 3. (4) Mécanismes cellulaires de la mémorisation*). Les résultats du traitement de l'information au sein de l'hippocampe sont ensuite renvoyés aux aires corticales adjacentes dans la région parahippocampique, puis sont relayés aux aires du cortex cérébral qui étaient la source de ces informations.

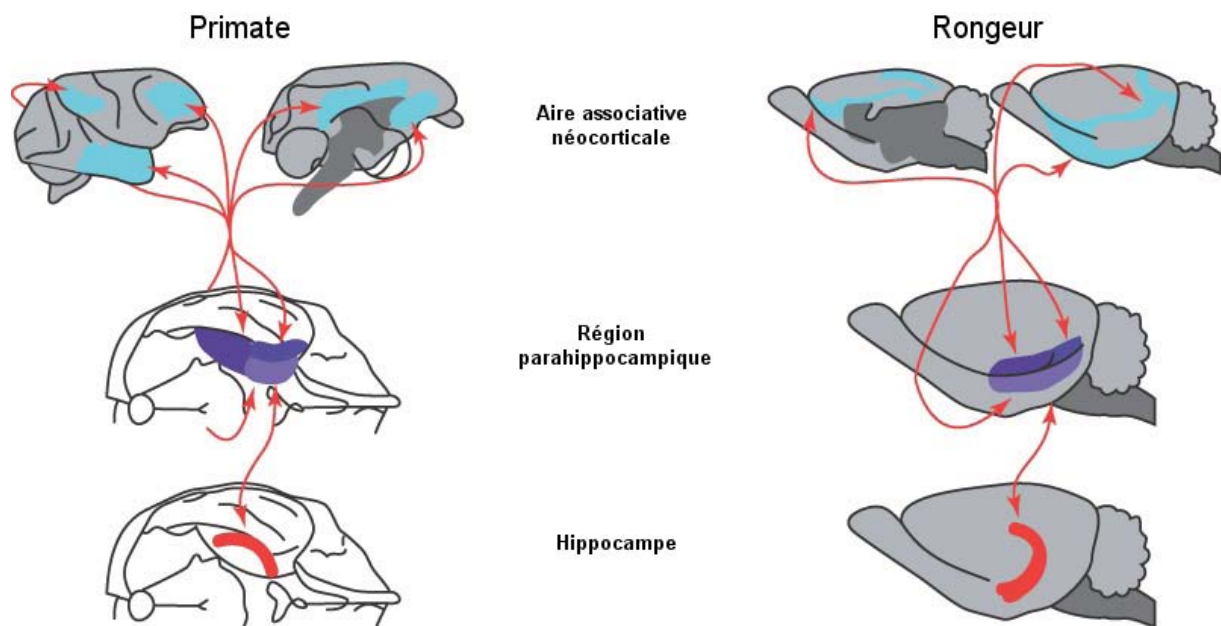


Figure 21. Anatomie du système de mémoire hippocampique chez le primate et le rongeur.

Le système de mémoire hippocampique inclut l'hippocampe et la région parahippocampique avec les cortex entorhinal, périrhinal et parahippocampique. (D'après, Manns et Eichenbaum, 2008)

(3.c) Le circuit amygdalien

Un circuit trisynaptique, parallèle au circuit de Papez, reliant l'amygdale au noyau dorsomédian du thalamus et au cortex préfrontal, a été récemment décrit par Mishkin chez le singe (Murray et Mishkin, 1998). Néanmoins, la destruction bilatérale des noyaux amygdaliens ne semble entraîner que très peu de troubles mnésiques ; mais elle est souvent associée aux lésions hippocampiques dont elle aggrave les conséquences.

L'amygdale reçoit également des informations de l'hypothalamus, du tronc cérébral et de l'hippocampe (**Figure 22**). Les lésions amygdaliennes bilatérales entraînent un émoussement émotionnel ainsi que des difficultés à distinguer les informations selon leur importance, ce qui empêche un apprentissage adapté. L'amygdale, à l'origine de certaines émotions, facilite non seulement la mémorisation, mais également la teinte émotive du souvenir.

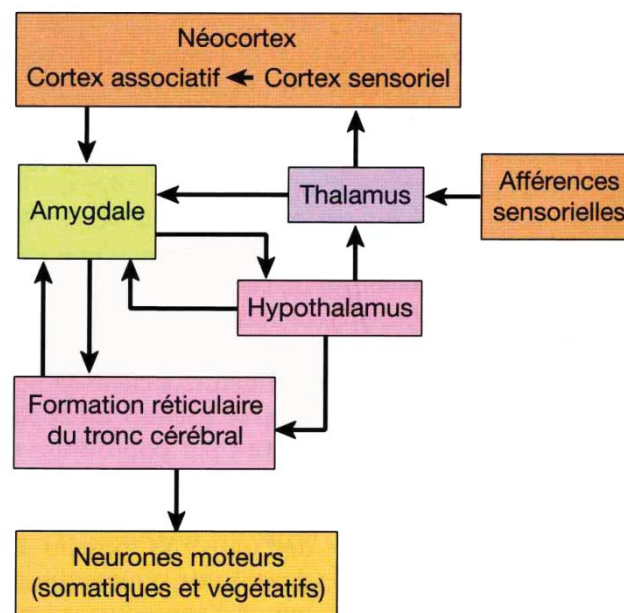


Figure 22. Principales connexions de l'amygdale

(D'après, Lavallard-Rousseau, 2011)

(3.d) Implication du striatum et des ganglions de la base

Le striatum est un composant majeur des ganglions de la base, et est impliqué dans les phénomènes de récompense et de motivation ainsi que dans le contrôle moteur. Le striatum reçoit des afférences corticales de nombreuses zones du cortex. Les projections sont organisées topographiquement de manière à ce que des projections convergentes et

divergentes au niveau de modules à l'intérieur du striatum puissent trier et associer les représentations somatosensorielles et motrices. Le striatum projette sur d'autres composants des ganglions de la base et sur le thalamus, lesquels projettent en retour sur les cortex moteur et pré-moteur mais également le cortex préfrontal (**Figure 23**).

Des études d'apprentissage chez le rat, montrent que, dans un labyrinthe en T simple, lorsque l'on met une récompense dans un bras du labyrinthe, le rat mémorise l'emplacement de la récompense en mémorisant la place de la récompense dans l'environnement (stratégie « de place »). Si on augmente la durée de l'entraînement, le rat ne mémorise plus l'emplacement de la récompense, mais sa localisation par rapport à son corps, par exemple si la récompense est toujours dans le bras de gauche, quel que soit l'orientation du labyrinthe, l'animal tournera à gauche (stratégie « de réponse ») (**Figure 24**). L'injection d'anesthésique dans l'hippocampe des animaux avant la phase de test a des conséquences sur la stratégie de place, mais aucune sur la stratégie de réponse. A l'inverse, l'injection dans le striatum a des conséquences uniquement sur la stratégie de réponse (Packard et McGaugh, 1996). Le striatum semble donc impliqué dans les apprentissages obtenus après accumulation de nombreuses répétitions, il forme ce que l'on pourrait appeler une mémoire d'habitude.

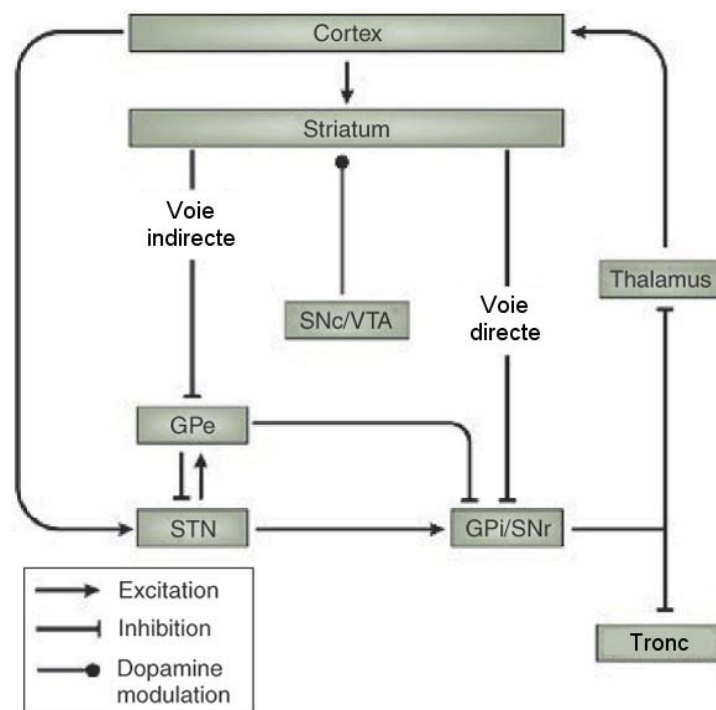


Figure 23. Anatomie des ganglions de la base.

STN : Noyau sub-thalamique

GPe : Globus pallidus externe

SNr : Substance noire pars reticulata

D'après (Manns et Eichenbaum, 2008)

SNc : Substance noire pars compacta

VTA : Aire tegmentale ventrale

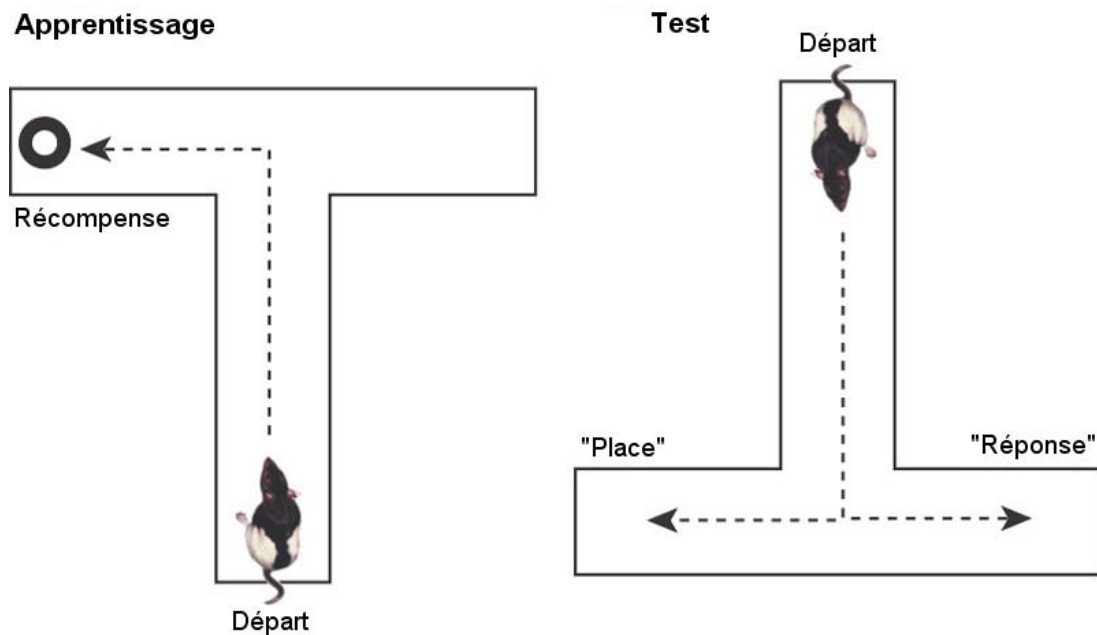


Figure 24. Apprentissage par stratégie « de place » vs « de réponse ».

(D'après, Manns et Eichenbaum, 2008)

Il semblerait que les ganglions de la base soient également impliqués dans l'acquisition d'habiletés motrices ou mémoire procédurale, qui requiert le développement de nouveaux programmes moteurs afin de guider la performance. Cette hypothèse repose notamment sur l'observation de la difficulté des patients atteints de la maladie de Parkinson ou de la chorée de Huntington (deux pathologies touchant les ganglions de la base) à acquérir des nouvelles habiletés motrices (Packard et Knowlton, 2002).

Certaines données indiquent que le cervelet serait impliqué dans certains aspects de la mémoire procédurale touchant à la motricité fine et au contrôle visuomoteur. Enfin, des données plus récentes, largement issues de l'expérimentation animale, indiquent que l'apprentissage des séquences d'actions basées sur la mise en œuvre de séquences motrices répétitives ne repose pas que sur les ganglions de la base mais sur des boucles reliant les différents composants de ces ganglions au cortex et aux structures du tronc cérébral. Ces boucles constituent le véritable support structural de la mémoire procédurale (Kreitzer et Malenka, 2008).

(3.e) Implication corticale

La mémoire sensorielle correspond à la capacité de saisir une information et de la restituer immédiatement, sans effectuer aucun traitement. Elle dépend de l'intégrité des cortex sensoriels qui possèdent tous des capacités de mémoire à court terme.

La mémoire de travail correspond à une forme particulière de mémoire à court terme au cours de laquelle l'information à retenir est manipulée. Plusieurs traitements peuvent être réalisés, du plus simple qui consiste à répéter mentalement l'information (par exemple lors de la composition d'un numéro de téléphone), aux plus élaborés par exemple les représentations mentales permettant d'effectuer un calcul ou des rotations mentales permettant de planifier une série de coups au cours d'une partie d'échec. Il est considéré que la mémoire de travail est contrôlée par un administrateur central localisé qui met en jeu deux systèmes esclaves spécialisés dans le type d'informations : la boucle phonologique et le carnet visuospatial pouvant interagir l'un sur l'autre (Baddeley, 2012). Il est généralement considéré que l'administrateur central est situé au niveau du cortex frontal et que les systèmes esclaves impliquent des aires cérébrales en relation avec la nature de l'information traitée (par exemple, cortex inférotemporal droit pour les informations visuospatiales). Chez l'animal entraîné dans des épreuves de réponses retardées, des cellules de délai spécifiquement activées à la suite de la présentation d'une information à retenir, ont été mises en évidence. Elles pourraient permettre le maintien « en ligne » de l'information et servir de support à une mémoire de travail. De tels neurones ont été enregistrés dans les cortex sensoriels (cortex inférotemporal visuel) et dans les régions dorsolatérales du cortex préfrontal (Shafi et al., 2007).

Nous avons déjà dit que les souvenirs d'enfance du patient HM étaient relativement intacts suggérant l'implication d'une autre structure que le lobe temporal médian dans le stockage à très long terme de la mémoire. Il est ainsi considéré que l'hippocampe contrôle la formation des souvenirs épisodiques et leur rappel pendant un certain nombre d'années. Pour les souvenirs plus anciens, l'hippocampe n'est plus indispensable et le rappel des souvenirs pourrait être obtenu directement à partir de leur représentation corticale (Frankland et Bontempi, 2005).

Enfin, pour qu'il y ait mémoire, il doit y avoir rappel de l'information. Le rappel de la mémoire épisodique met en jeu les lobes frontaux. Des données en imagerie cérébrale ont révélé que la phase de rappel s'accompagne d'une activation du cortex frontal dont l'intensité est proportionnelle à celle des processus de recherche mis en œuvre. Le rôle déterminant du cortex préfrontal dans les processus de recherche de l'information épisodique indique que cette structure cérébrale, largement connectée avec le lobe temporal médian (**Figure 25**), fait

partie du réseau structural sous-jacent à la mémoire épisodique (Sakai, 2003; Wheeler et Buckner, 2004).

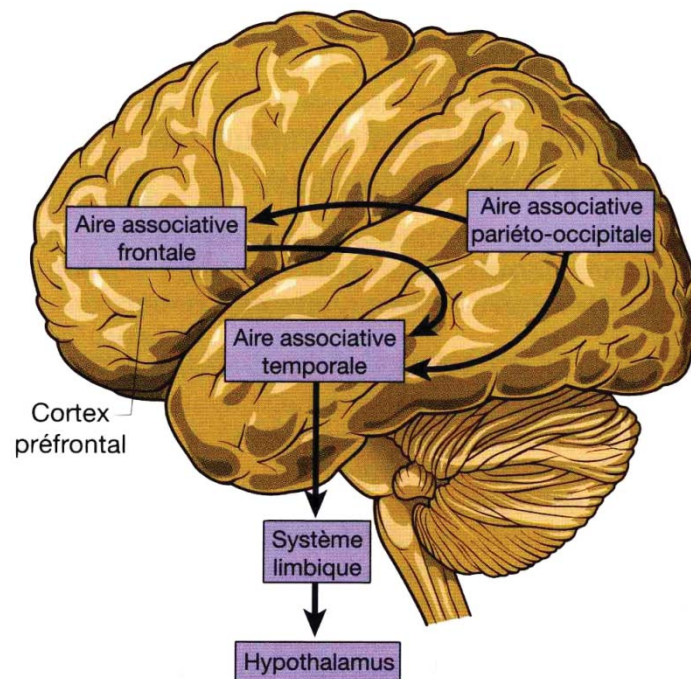


Figure 25. Interconnexions entre le cortex frontal et le lobe temporal

(D'après, Lavallard-Rousseau, 2011)

(3.f) En résumé

Il est actuellement accepté de considérer que l'acquisition de la mémoire déclarative à long terme, c'est-à-dire les processus de mémorisation, dépend de l'intégrité des circuits limbiques, comprenant notamment l'hippocampe et ses connexions sous-corticales avec les corps mamillaires et le thalamus dorsal. L'hippocampe est la partie du cerveau qui stocke les souvenirs de façon momentanée avant de les transférer dans des régions spécialisées du cortex cérébral. L'hippocampe est donc un site temporaire de stockage des souvenirs.

Le stockage de la mémoire déclarative à long terme est situé dans le cortex, sous forme de traces mnésiques largement distribuées dans le cerveau (souvenirs de nature visuelle, auditive, olfactive émotionnelle...).

La mémoire procédurale n'implique pas le circuit limbique. On sait que l'acquisition d'habiletés motrices dépend d'un système corticostriatal organisé autour de trois grandes structures : le cervelet, les noyaux gris centraux (principalement le striatum) et les cortex pariétal postérieur et frontal.

Bien que nous ayons décrit les systèmes de mémoire de façon indépendante, tout porte à croire que ces systèmes peuvent fonctionner en parallèle et que, dans une situation déterminée, le système de mémoire le plus adapté va prendre le contrôle du comportement. Cependant, si la situation se modifie, l'autre système de mémoire peut devenir prépondérant. De plus certaines structures cérébrales, comme le cortex préfrontal sont impliquées dans plusieurs systèmes de mémoire et peuvent jouer le rôle d'interface entre les différents systèmes mnésiques (**Figure 26**).

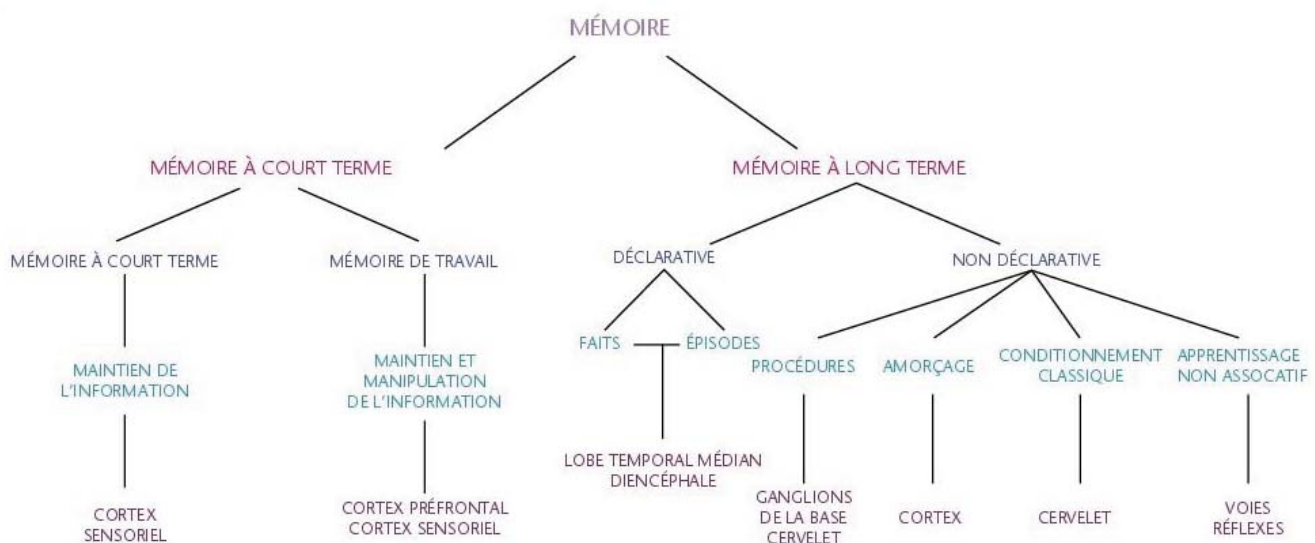


Figure 26. Représentation schématique des structures impliquées dans les différents types de mémoire.

(4) Mécanismes cellulaires de la mémorisation

En 1949, Hebb émet l'hypothèse que l'activité corrélée de neurones interconnectés pouvait modifier les connexions synaptiques entre ces neurones, modification qui serait la base cellulaire de notre mémoire. Le phénomène de *potentialisation à long terme* (PLT) découvert en 1973 par T.V.P. Bliss et T. Lomo vint confirmer ce postulat (**Figure 27**). Ce terme décrit une augmentation durable de l'efficacité synaptique après stimulation tétanique des afférences excitatrices des circuits hippocampiques. Le mécanisme de la PLT fait intervenir une libération de glutamate, qui se fixe sur des récepteurs NMDA, couplés à des canaux calciques. L'ouverture de ces derniers entraîne un afflux massif de calcium dans la cellule, ce qui induit une cascade de réactions telles que l'activation de protéines kinases ou la synthèse de protéines responsables de modifications cellulaires à long terme. Cette plasticité synaptique, induite en quelques millisecondes, peut durer de quelques heures à plusieurs semaines. Un autre exemple de modification synaptique participant à la mémorisation notamment au cours de l'apprentissage moteur est la *dépression à long terme* (DLT) dans le cervelet.

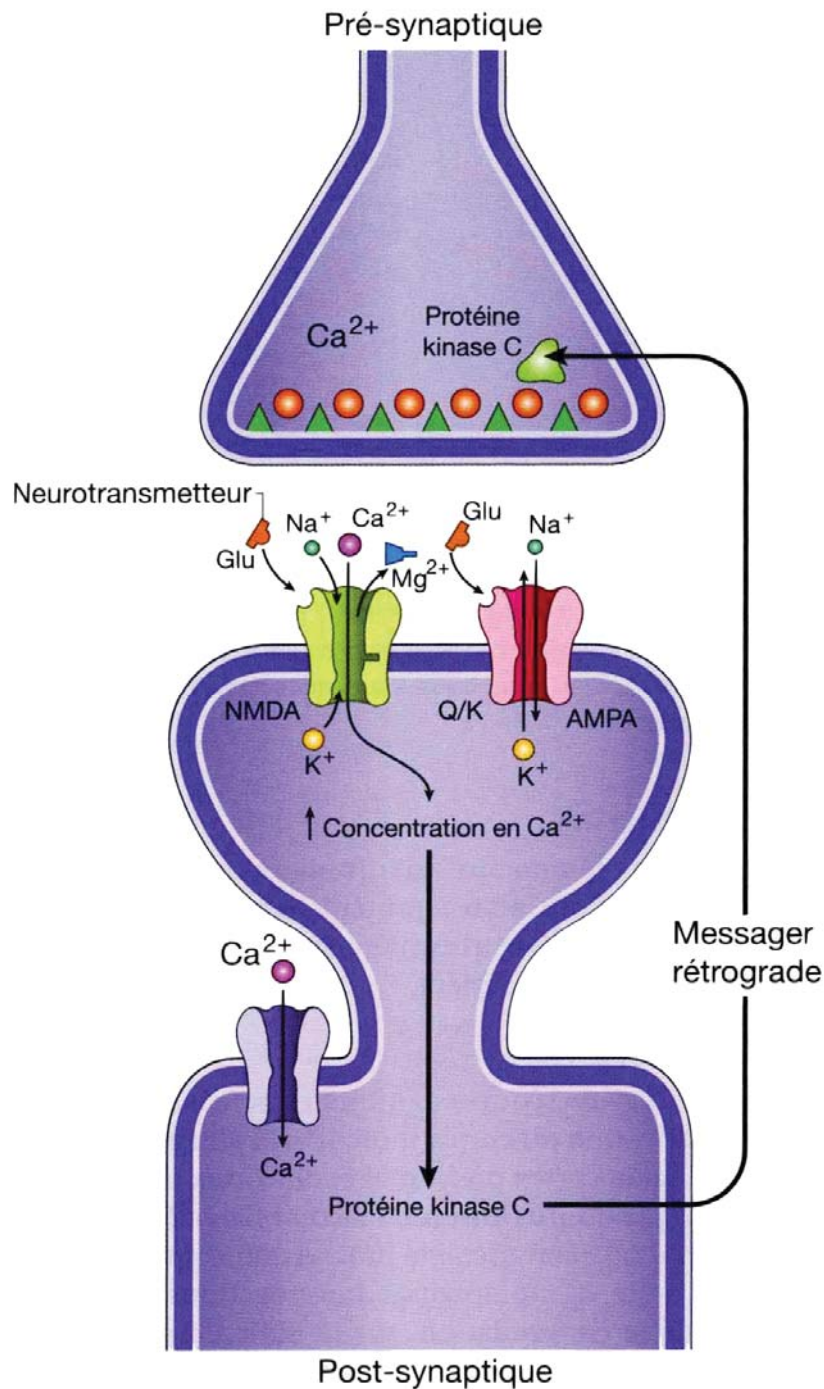


Figure 27. Mécanisme cellulaire de la potentialisation à long terme.

La stimulation à haute fréquence dépolarise suffisamment la cellule post-synaptique pour lever le blocage du canal NMDA exercé par les ions Mg^{2+} et fixer le glutamate. Le canal NMDA étant ouvert, les ions Ca^{2+} pénètrent dans la cellule post-synaptique, activant les protéines kinases qui libèrent un facteur rétrograde (la protéine kinase C) agissant sur les processus présynaptiques de libération de neurotransmetteurs. (D'après, Lavallard-Rousseau, 2011)

Les travaux de Kandel chez l'aplysie ont permis de montrer lors de l'étude des réflexes d'habituation ou de sensibilisation, puis pour un apprentissage plus complexe, le conditionnement classique qu'une seule série de stimulations téaniques entraînait une modification du réflexe mais de manière transitoire alors que plusieurs séries de stimulations entraînaient une modification beaucoup plus profonde et durable. Dans le premier cas, modèle de mémoire à court terme, les modifications synaptiques sont uniquement fonctionnelles au sein de la synapse avec un changement transitoire de la conformation des récepteurs glutamatergiques post-synaptiques. Dans le second cas, exemple de mémoire à long terme, les conséquences sont fonctionnelles et structurelles : la stimulation répétée des récepteurs glutamatergiques entraîne une cascade de réactions enzymatiques, mais aussi géniques par l'intermédiaire de facteurs de transcription avec, en conséquence, des modifications structurelles durables pré- et post-synaptiques (Kandel, 2001).

(5) Bases moléculaires de la mémoire

La mémoire est le résultat d'une coopération entre les systèmes hiérarchisés opérant à différents niveaux de l'organisation cérébrale. Nous nous limiterons à décrire les hypothèses actuelles de travail visant à un débouché thérapeutique.

▪ *Glutamate*

Comme nous venons de le présenter, les phénomènes de DLT et PLT sont étroitement liés aux récepteurs post-synaptiques AMPA et NMDA qui sont des récepteurs au glutamate.

▪ *Acétylcholine*

C'est le neuromédiateur qui paraît le plus impliqué dans ces processus :

- un déficit cholinergique dans les démences de type Alzheimer est désormais démontré avec une atteinte précoce des neurones cholinergiques corticaux et aussi des principaux noyaux cholinergiques au premier rang desquels le noyau basal de Meynert, de plus dans ces pathologies, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, enzyme de dégradation de l'acétylcholine ont montré une certaine efficacité clinique.
- les récepteurs muscariniques ont une densité élevée dans l'hippocampe.
- les anticholinergiques perturbent l'apprentissage et la mémoire chez l'animal, effets qui sont renversés par les anticholinestérasiques.

Une augmentation de l'activité cholinergique dans l'hippocampe et le cortex frontal est nécessaire à la mémorisation. Cette augmentation assurerait la consolidation des informations. Cependant, les effets de l'acétylcholine dans le SNC ne sont pas encore pleinement identifiés.

- *Noradrénaline (NA)*

Le système cœruléo-cortical pourrait contrôler l'attention sélective dont le rôle, dans les processus mnésiques, est essentiel. Une interaction entre les systèmes NA et cholinergique au niveau de l'hippocampe et au niveau de la région septale a été décrite. L'administration d'un antagoniste noradrénergique dans la région septale reproduit les déficits mnésiques observés lors du vieillissement chez le rat.

Par ailleurs, les systèmes catécholaminergiques interviendraient tout particulièrement lors des apprentissages d'événements chargés émotionnellement. La NA libérée (principalement par le locus cœruleus, par exemple au cours d'un stress) au niveau du noyau basolatéral de l'amygdale potentialiserait l'activité des neurones de l'amygdale dans les heures qui suivent un apprentissage, permettant ainsi une consolidation de la trace mnésique, ces neurones du complexe amygdalien facilitant ensuite à leur tour la plasticité synaptique d'autres structures cérébrales et notamment temporelles.

- *Sérotonine (5-HT)*

Les liens entre mémoire et systèmes sérotoninergiques restent mal connus. Plusieurs sous-types de récepteurs ont été impliqués dans les processus mnésiques mais avec des actions variables. Par exemple, les agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} perturbent l'apprentissage et les agonistes 5-HT_{2A/2C} et 5-HT₄ l'améliorent. La plupart des antagonistes des récepteurs 5-HT testés ne modifient pas les processus de mémorisation chez l'animal, à l'exception des antagonistes 5-HT_{2A/2C}. Les médicaments connus pour accroître la transmission sérotoninergique cérébrale altèrent les performances mnésiques lors de certains tests.

Enfin, chez l'homme, si une diminution de l'innervation sérotoninergique corticale est aujourd'hui connue au cours des démences de type Alzheimer, l'efficacité des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine n'est pas démontrée.

b. L'anxiété

(Pour revue, Hohoff, 2009),

L'anxiété est un symptôme fréquent, dont l'intensité peut être très variable, pouvant être modérée et constante, ou bien intense et aiguë. Sa forme pathologique la plus fréquente, l'attaque de panique (ou crise d'angoisse aiguë), qui touche environ 5% de la population générale, est présente dans de nombreux troubles psychiatriques (trouble panique, attaque de panique, anxiété généralisée, troubles phobiques, troubles obsessionnels compulsifs, bouffée délirante aiguë, schizophrénie,...) ainsi que lors d'intoxications aiguës ou chroniques (alcool,

cannabis, cocaïne,...) ou de pathologies organiques (angor, infarctus du myocarde, embolie pulmonaire, asthme, AVC, hypoglycémie, etc...).

Les réactions d'anxiété combinent des composantes somatiques, cognitives, émotionnelles et comportementales représentant des mécanismes de l'évolution pour survivre ou faire face à de potentielles menaces. Dans certaines circonstances, la réponse adaptative ou normale à un stress peut basculer en une réponse excessive ou inadaptée et peut se manifester par des troubles anxieux (Plomin et al., 1994; Finn et al., 2003). Diverses approches existent pour étudier les bases biologiques complexes et les mécanismes fonctionnels sous-tendant la pathogenèse de l'anxiété humaine. Un outil particulièrement intéressant est l'utilisation de modèles souris qui développent des réactions autonomiques et comportementales similaires à l'Homme durant des épisodes d'anxiété (Bourin et al., 2007). De plus, les circuits cérébraux de l'anxiété impliquant principalement des structures telles que l'amygdale, l'hippocampe, le cortex cingulaire ou encore l'hypothalamus (Gordon et Hen, 2004), ainsi que les neurotransmetteurs et les systèmes neuromodulateurs, sont hautement conservés entre les deux espèces et possèdent de fortes homologues fonctionnelles (Chrousos, 1998; Leonardo et Hen, 2006).

(1) Structures cérébrales et circuits de l'anxiété

(Pour revue, Millan, 2003; Mathew et al., 2008)

Les circuits de l'anxiété impliquent une communication entre diverses structures cérébrales (**Figure 28**):

En 1937, Papez décrit pour la première fois les bases neuroanatomiques et physiologiques de l'expression des émotions et de la peur (Papez, 1937). Le circuit qu'il décrit comprend une projection (le fornix) depuis l'hippocampe vers les corps mamillaires qui sont eux-mêmes liés au noyau antérieur du thalamus : le *thalamus antérieur* est connecté au *cortex cingulaire* qui ferme le circuit en transmettant l'information à l'*hippocampe*. Cette description du système limbique est précisée dans les travaux de McLean (1949, 1952), qui rectifie l'omission de l'*amygdale* et décrit un réseau englobant le cortex frontal et d'autres noyaux sous-corticaux, comme le *septum* et le *noyau accumbens* (Barili et al., 1998; Pralong et al., 2002). Le septum est intégré au « système d'inhibition comportementale septo-hippocampique », soumis à des modulations via des entrées corticales (Gray, 1987; Gray et McNaughton, 2000). Une autre région du système limbique, l'*insula* régule le système nerveux autonome (Oppenheimer et al., 1992), et comme l'amygdale, est activée pendant les épisodes émotionnels négatifs (Phan et al., 2002).

Dans ce circuit, l'élément central est l'amygdale, structure clé de coordination des réponses de peur étroitement liées à l'anxiété (Davis, 1992; Kim et al., 2011) et qui communique avec toutes les autres structures (**Figure 29**):

- *Interactions au sein même de l'amygdale* : cette structure complexe est composée de multiples sous-noyaux, chacun avec son propre profil de projections afférentes et efférentes. Le complexe basolatéral et le noyau central ont un intérêt particulier dans l'anxiété (Heimer et al., 1999). Le complexe basolatéral est le premier site d'entrée des informations dans l'amygdale, recevant les informations sensorielles depuis le noyau thalamique et les cortex associatifs sensoriels (Amaral et al., 1992), et il fournit également la majorité des projections corticales et thalamiques depuis l'amygdale. Au contraire, le noyau central est une région de sortie des informations qui projette vers des cibles du tronc cérébral, hypothalamiques et du cerveau antérieur basal (Paxinos et Mai, 2003), et est localisé en position dorsale au complexe basolatéral (Mai et al., 1997). Le noyau central coordonne l'information venant de divers noyaux pour générer une réponse comportementale suite au stimulus (Pitkänen et al., 1997). Chez la souris, l'amygdale basolatérale permet l'identification du degré de menace d'un stimulus, tandis que le noyau central est essentiel pour les réponses défensives de peur spécifiques de l'espèce (Davis et Whalen, 2001).

- *Interactions avec l'hippocampe* : mise à part son rôle dans la modulation émotionnelle de la mémoire, l'hippocampe aurait également une implication dans les processus d'anxiété. Contrairement à l'hippocampe dorsal, l'hippocampe ventral est fortement interconnecté à l'amygdale et l'hypothalamus (Bannerman et al., 2004). Des lésions ou une inactivation uniquement de l'hippocampe ventral, mais pas de l'hippocampe dorsal, induisent une diminution des comportements liés à l'anxiété chez le rat (Kjelstrup et al., 2002; Bannerman et al., 2004). L'hippocampe fournit à l'amygdale des informations sur le contexte dans lequel un potentiel stimulus menaçant se présente, et a la capacité de récupérer l'information depuis la mémoire explicite. Un dysfonctionnement de l'hippocampe résulte en une faible discrimination contextuelle des stimuli, qui peut être liée à une généralisation excessive des réponses de peur, une caractéristique des désordres anxieux.

- *Interactions avec le cortex préfrontal (CPF)* : Des activations corticales conséquentes à une stimulation émotionnelle ont été retrouvées le long de la paroi interne du CPF, incluant le cortex cingulaire antérieur, ainsi que dans certaines zones du CPF latéral. Deux groupes préfrontaux médians distincts ont été identifiés : le premier est constitué de l'aire motrice présupplémentaire dans le CPF médian postérieur et est associé à une co-activation dans plusieurs structures du CPF latéral. Ce profil de co-activation suggère que ce groupe « cognitif/moteur » reflète vraisemblablement les processus attentionnels ou exécutifs

impliqués dans les émotions. Le second groupe est plus antérieur et comprend le cortex cingulaire antérieur dorsal, région sus-jacente au CPF dorso-médian, et s'étend dans le cortex cingulaire antérieur rostral et des portions du cortex cingulaire antérieur subgénéral. Les régions de ce groupe sont co-activées avec l'amygdale et la substance grise périaqueducal, suggérant un rôle important dans les émotions. Au-delà des différents fonctionnements entre les régions du système limbique et le CPF médian, il semble évident que ces régions communiquent entre elles. L'évaluation émotionnelle par le CPF dorso-médian et le cortex cingulaire antérieur se fait par l'intermédiaire de projections directes depuis les régions limbiques (Ghashghaei et al., 2007) et indirectement via des projections préfrontales ventromédian-limbiques (Stein et al., 2007).

- *Interaction avec les circuits thalamo-striato-corticaux* : Le flux d'informations à travers les circuits thalamo-striato-corticaux est clôturé au niveau du thalamus, permettant une certaine régulation de ce flux. L'information sensorielle venant du thalamus et des aires corticales converge vers le noyau latéral de l'amygdale (LeDoux, 1998) qui projette vers le noyau central, basal et basal accessoire.

(2) Bases moléculaires de l'anxiété

(Pour revue, Millan, 2003)

Dans le réseau complexe sous-tendant les mécanismes d'anxiété, des modulateurs neurochimiques peuvent affecter l'activité à l'intérieur de chacune des aires cérébrales et tout au long du circuit, créant ainsi un grand nombre de potentielles cibles pharmacologiques.

Nous verrons ici tout d'abord les deux principaux neurotransmetteurs impliqués dans les processus d'anxiété, le glutamate et le GABA, puis des neuromodulateurs jouant un rôle important dans l'anxiété, regroupés dans le système à monoamines : 5-HT, dopamine, adrénaline et NA, ainsi que des neuropeptides (tachykinines, neuropeptide, galanine).

(2.a) Le glutamate et le GABA

Le *glutamate* et le *GABA* sont les deux principaux neurotransmetteurs assurant le fonctionnement synaptique.

- Le *glutamate* est le principal neurotransmetteur excitateur dans le cerveau, étant donné son omniprésence dans les régions corticolimbiques, il n'est guère surprenant qu'ils remplissent plusieurs rôles dans les réponses cognitives et émotionnelles à la peur. De plus, une perturbation de la transmission glutamatergique est impliquée dans les symptômes affectifs et mnésiques de nombreuses pathologies psychiatriques et neurologiques, incluant les troubles anxieux (Carlsson et Carlsson, 1990; Millan, 2002; Moghaddam, 2002).

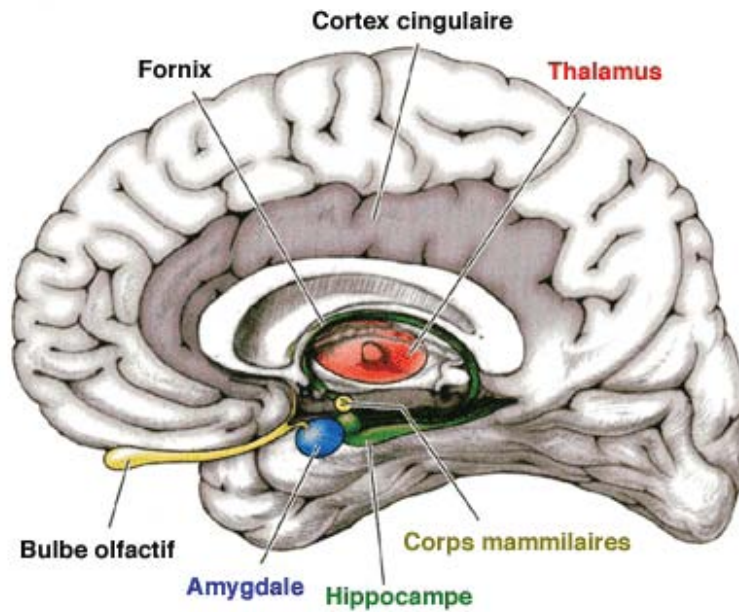


Figure 28. Principales structures cérébrales impliquées dans les circuits de l'anxiété.

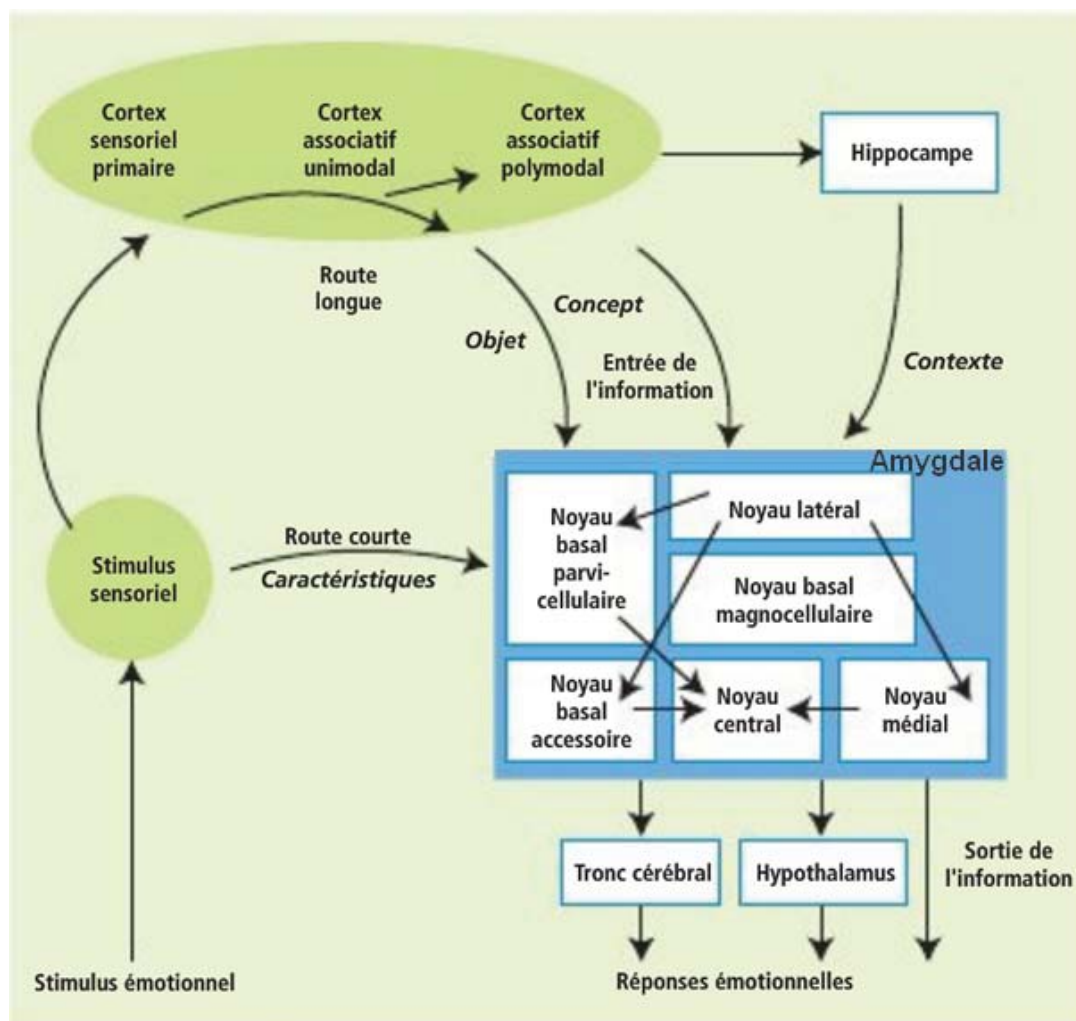


Figure 29. Les circuits de l'anxiété. Interconnexion entre les différentes structures cérébrales impliquées dans le traitement de l'information des stimuli extérieurs et de la réponse appropriée.

(D'après, Martin, 2006).

Des études précliniques ont montré que le glutamate stimulait la libération de CRF (pour corticotropin-releasing factor) de façon concentration-dépendante dans des neurones d'amygdale de rat en culture, effet bloqué par l'administration d'un antagoniste NMDA (récepteur au glutamate de type ionotropique) (Cratty et Birkle, 1999).

- Le *GABA* est le principal neurotransmetteur inhibiteur et a un rôle central dans les processus d'anxiété. Les structures corticolimbiques impliquées dans la modulation de l'anxiété comme l'hippocampe, le septum latéral, le gris périaqueducal et l'amygdale, contiennent des réseaux majeurs d'interneurones GABAergiques (Cherubini et Conti, 2001; Mody, 2001). Les voies GABAergiques exercent une influence inhibitrice sur la libération de beaucoup de neurotransmetteurs connus pour avoir une action anxiogénique, comme le glutamate et les monoamines. L'alcool, barbituriques et benzodiazépines ont un effet direct sur le GABA, facilitant son action inhibitrice, et ainsi rendant difficile l'excitation du neurone post-synaptique par le glutamate. L'alcool augmente l'inhibition en agissant directement sur le récepteur du GABA. Les barbituriques agissent de la même façon, mais sur des récepteurs GABA différents de ceux de l'alcool. Quant aux benzodiazépines, elles ont leurs propres récepteurs reliés à ceux du GABA qui, lorsqu'ils sont occupés, facilitent la liaison du GABA avec son récepteur. Les benzodiazépines agissent donc uniquement là où le GABA est relâché de façon naturelle, c'est-à-dire par exemple face à un stimulus menaçant, au niveau des synapses traitant la menace. Le contrôle global des états d'anxiété par les mécanismes GABAergiques implique (1) la modulation de la transmission monoaminergique, (2) des interactions avec les récepteurs monoaminergiques post-synaptiques et (3) des activités indépendantes des voies monoaminergiques

La production d'un PA et donc du transfert de l'information, dépend donc de la relation entre le glutamate excitateur et le GABA inhibiteur, le glutamate devant, pour déclencher un PA, franchir la garde exercée par le GABA. Si la capacité des neurones GABA à filtrer les stimuli anodins est compromise, soit parce qu'ils sont moins actifs, soit parce que les neurones de projection déchargent plus facilement leurs potentiels d'action, ces stimuli seront alors pris pour des signaux de danger. Ce possible dysfonctionnement pourrait entraîner des troubles de l'anxiété.

(2.b) Les monoamines

L'activité neuronale peut être influencée par certains neuromodulateurs : les monoamines, tels que la 5-HT, la dopamine et la NA. Ainsi, lors de menaces, 5-HT, NA et dopamine sont libérées dans de larges aires du cerveau antérieur incluant le CPF, l'hippocampe et l'amygdale, mais également au niveau du tronc cérébral. Ces neuromodulateurs seront surtout

actifs au niveau des circuits en action, et pourront moduler le fonctionnement synaptique, et donc l'activité de ces structures cérébrales.

- Le *système sérotoninergique* : des anomalies de la fonction sérotoninergique dans l'anxiété peut être le fruit de divers processus, incluant une déficience ou une innervation excessive de certaines structures clés, et/ou des mécanismes cellulaires induisant une neurotransmission aberrante. Au niveau cellulaire, les anomalies peuvent inclure un défaut de régulation de libération ou de recapture de 5-HT (rôle des récepteurs présynaptiques) ou une réponse anormale au signal 5-HT (rôle des récepteurs post-synaptiques). Il est aujourd'hui clair que l'induction d'une altération de la neurotransmission sérotoninergique implique des autorécepteurs (5-HT_{1A/1D}), le site transporteur de recapture de la 5-HT (SERT) et de nombreux sous-types de récepteurs post-synaptiques, dont certains ont un rôle particulièrement important dans l'humeur et l'anxiété (Roth, 2000; Hoyer et al., 2002; Durant et al., 2010; Pytliak et al., 2011).

- Le *système noradrénergique* : Le système noradrénergique, dont les corps cellulaires proviennent du locus coeruleus et d'autres noyaux médullaires et pontiques, possède des connexions étendues avec les structures du circuit de la peur. Il constitue avec le système CRF, le principal système de réponse lié au stress. Le locus coeruleus projette vers le CPF, le cortex entorhinal, le thalamus, les noyaux de la strie terminale, l'hippocampe, la SPGA, le thalamus, l'hypothalamus et les noyaux du tractus solitaire (Chrousos et Gold, 1992). En réponse à l'activation du locus coeruleus liée au stress, la branche adrénomédullaire du système nerveux autonome libère de l'adrénaline. L'activation du système nerveux autonome via le locus coeruleus produit divers effets, notamment l'activation des systèmes pulmonaire et cardiovasculaire et la suppression des systèmes urogénital et gastro-intestinal (Chrousos, 1998). Des modèles animaux impliquant une variété de facteurs de stress physiques et comportementaux/psychologiques ont montré de nets changements dans le système NA en réponse au stress (Tanaka et al., 2000). Une exposition à des stimuli stressants est associée à une augmentation de la libération de NA et des changements dans le locus coeruleus, l'hypothalamus, l'hippocampe et le noyau basolatéral de l'amygdale (Glavin, 1985; Tsuda et Tanaka, 1985). Des liens entre les systèmes sérotoninergique et noradrénergique pourraient jouer un rôle déterminant dans la régulation de l'humeur et l'anxiété. Des projections sérotoninergiques depuis le noyau du raphé dorsal inhibe la transmission au locus coeruleus, tandis que les projections noradrénergiques depuis le locus coeruleus ont un effet excitateur sur les corps cellulaires dans le raphé dorsal. La balance entre 5-HT et NA influence ainsi le niveau de décharge du locus coeruleus.

- Le système dopaminergique : Les voies dopaminergiques centrales sont très étudiées pour leur rôle dans la pathogenèse de la dépression, la toxicomanie, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, pathologies impliquant une dérégulation de la transmission dopaminergique. Cependant, peu d'attention s'est portée sur le rôle de la dopamine dans la réponse et la modulation des états anxieux (Thiel et Schwarting, 2001; Stein et al., 2002), malgré l'implication connue des voies dopaminergiques mésolimbique et mésocorticale sensibles au stress, dans le contrôle de l'humeur (Swanson, 1982; Le Moal et Simon, 1991; Homberg et al., 2002; Hasue et Shammah-Lagnado, 2002). Des études ont, en effet, montré qu'il est nécessaire d'avoir un degré « optimal » d'activité dopaminergique pour obtenir une réponse appropriée à la peur et au stress (Pezze et al., 2003).

La relation entre la transmission dopaminergique et les désordres anxieux est complexe. Il est clair que la phobie sociale est associée à une suppression de la transmission et de l'activité des récepteurs dopaminergiques (Tiihonen et al., 1997; Kennedy et al., 2001; Stein et al., 2002). A l'inverse des études ont montré chez des sujets avec un niveau d'anxiété élevé et prédisposés aux attaques de panique, une augmentation de l'activité des voies dopaminergiques centrales (Roy-Byrne et al., 1986; Pitchot et al., 1992; Mizuki et al., 1997). De plus, des études d'imagerie par résonance magnétique (IRM) fonctionnelle, ont montré que la dextroamphétamine, un psychostimulant libérateur de dopamine, augmente les réponses de l'amygdale à des stimuli aversifs chez l'Homme (Hariri et al., 2002). Ces observations suggèrent que l'apport dopaminergique à l'amygdale est impliqué spécifiquement dans la médiation des propriétés anxiogéniques de ce psychostimulant et potentiellement d'autres agents dopaminergiques (Willick et Kokkinidis, 1995; Paine et al., 2002).

(2.c) Les neuropeptides

Parmi les neuropeptides impliqués dans les processus d'anxiété on trouve les peptides takykinines (substance P, neurokinine A, neurokinine K), le neuropeptide Y et la galanine.

- La substance P est distribuée à travers tout le cerveau, la ME, et le SNP. Bien que ce peptide soit surtout étudié pour son rôle dans les processus d'inflammation et de douleur, il semble qu'il soit bien placé pour moduler l'activité neuronale dans les aires cérébrales impliquées dans la physiopathologie des troubles anxieux et de l'humeur. Les aires limbiques dans lesquelles la substance P a été identifiée, incluent l'amygdale, l'hypothalamus, le locus coeruleus, l'hippocampe et la SPGA. La substance P est fréquemment co-localisée dans les neurones contenant d'autres neurokinines et neurotransmetteurs comme la 5-HT, le GABA, le glutamate, l'acétylcholine et la dopamine, et influence souvent leur libération synaptique

(Otsuka et Yoshioka, 1993). De nombreuses études précliniques ont montré les effets anxiogéniques de la substance P (Commons et al., 2003). Les mécanismes précis d'action de la substance P ne sont pas encore élucidés mais il semblerait qu'elle puisse moduler les comportements induits par l'anxiété et le stress via le système 5-HT (Santarelli et al., 2001), cependant d'autres auteurs ont montré que des récepteurs à la neurokinine dans le gris périaqueducal et le noyau du raphé dorsal seraient principalement localisés sur les neurones glutamatergiques, suggérant que la substance P agirait essentiellement sur les neurones glutamatergiques dans ces régions d'importance dans les processus d'anxiété (Commons et al., 2003). Il a également été montré que la substance P pouvait augmenter l'activité des neurones du locus coeruleus.

- Le *neuropeptide Y* : C'est l'un des peptides les plus communs, trouvés à la fois dans le SNC et le SNP. Les récepteurs du neuropeptide Y sont localisés dans diverses régions cérébrales, incluant le cortex, et diverses structures sous-corticales impliquées dans les circuits de la peur (l'amygdale, l'hypothalamus, les noyaux du tronc cérébral) (Dumont et al., 1995, 1996). Des études sur des modèles animaux d'anxiété ont montré que le neuropeptide Y possède des effets anxiolytiques (Griebel, 1999).

- La *galanine* : Il s'agit d'un peptide exprimé par les cellules noradrénergiques du locus coeruleus, de l'hippocampe et le cortex. Dans le locus coeruleus, la galanine est co-localisée avec la NA et potentialise les effets de la NA localement au niveau des adrénorécepteurs (Hökfelt et al., 1999). Dans le cortex et l'hippocampe, la galanine agit également en atténuant le niveau de décharge et inhibant la libération de NA. L'expression des ARNm de la galanine apparaît en réponse au stress, avec une diminution d'expression survenant en période de stress aigu, suivi par un retour à un niveau normal en quelques jours, puis une augmentation de l'expression de la galanine si le stress persiste (Holmes et al., 1995; Sweerts et al., 1999). Le stress chronique induirait une expression excessive de galanine potentialisant l'auto-inhibition du locus coeruleus, réduisant ainsi l'activité tonique de ce dernier et contribuant alors potentiellement aux symptômes dépressifs observés dans certaines pathologies anxieuses comme le syndrome post-traumatique (Harro et Oreland, 2001).

II. LA MYÉLINE DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL ET SA PATHOLOGIE

A. Définition

(Pour revue, Bradl et Lassmann, 2010)

La myéline est une structure lipo-protéique formée par des extensions de la membrane plasmatique gliale des OLs dans le SNC (**Figure 30**) et des cellules de Schwann dans le SNP. Elle forme, par son enroulement condensé en spirale autour de l'axone, une gaine compacte multilamellaire, séparée par de courts segments axonaux non myélinisés appelés *nœuds de Ranvier* et riches en canaux ioniques. Cette architecture régulière permet à la myéline d'assurer la propagation saltatoire et rapide du potentiel d'action le long de l'axone d'un nœud de Ranvier à l'autre. Seuls les axones de diamètre supérieur à $0,2\ \mu\text{m}$ sont myélinisés.

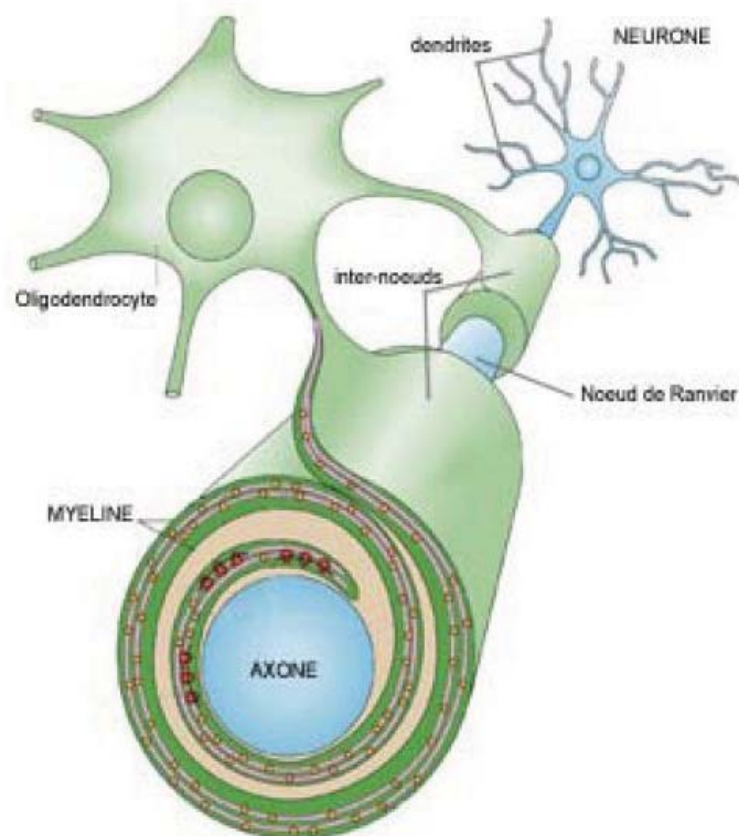


Figure 30. Schématisation de l'enroulement des prolongements oligodendrocytaires autour de l'axone pour former la gaine compacte de myéline.

B. Organisation de la myéline

La myéline se répartit de façon segmentaire le long de l'axone, formant successivement des zones de myéline compacte appelées *internodes*, bordées de zones de myéline décompactée appelées *paranodes* et *juxtaparanodes*, suivies d'une région axonale étroite non myélinisée appelée *nœud de Ranvier*. Chacune de ces régions possèdent des spécificités structurales et moléculaires (**Figure 31**).

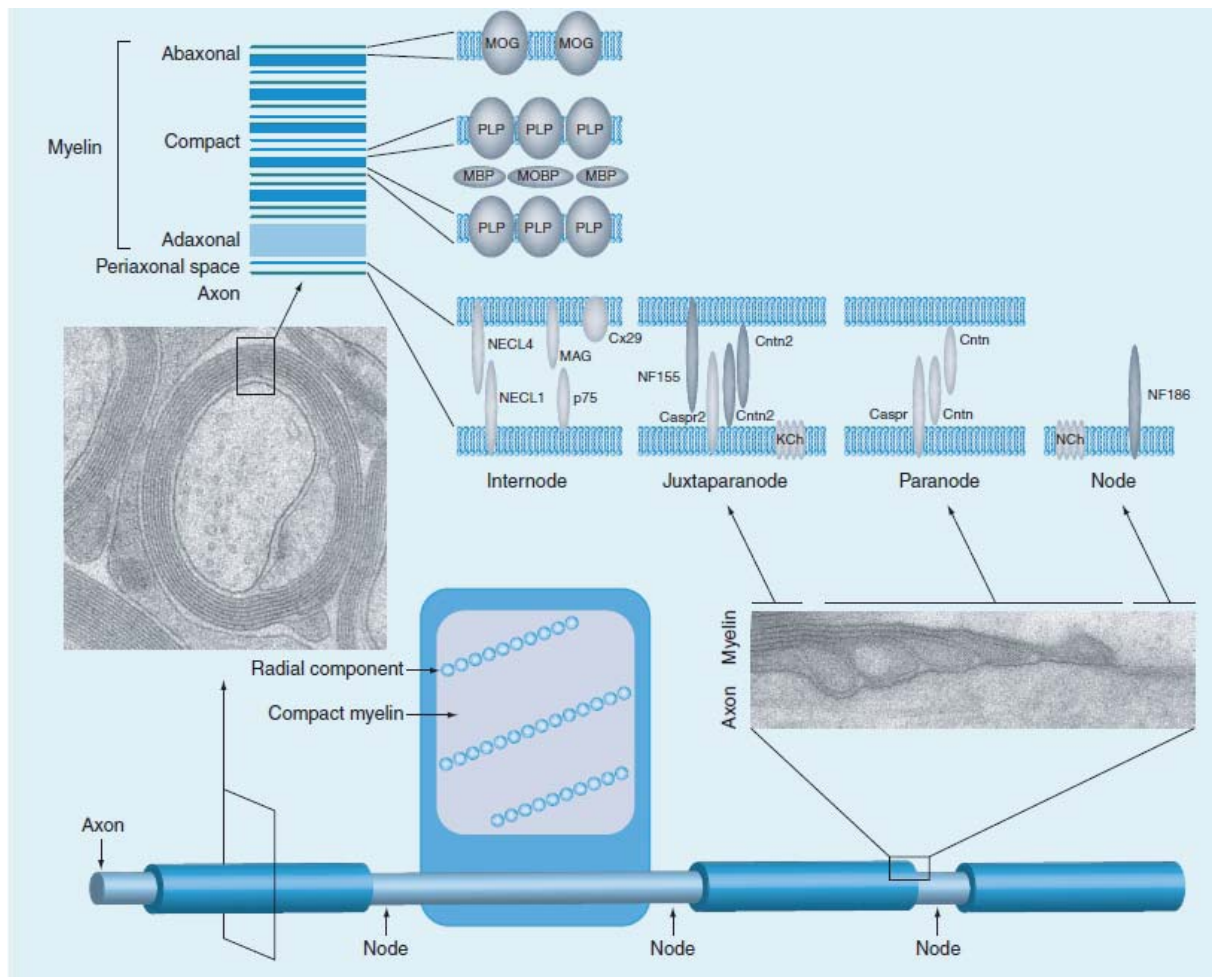


Figure 31. Description des différentes structures de la myéline.

La myéline compacte présente une ultrastructure périodique. Dans le système nerveux central, la compaction requière l'expression abondante de protéines de structures, telles que la protéolipoprotéine (PLP) et la protéine basique de la myéline (MBP). Les segments d'axone myélinisés sont accolés aux nœuds de Ranvier, sites de concentration des canaux Na^+ et d'initiation des potentiels d'action. A cet endroit, une zone de contact axone-glie spécialisée (la jonction paranodale) sépare l'espace péri-axonale internodale du milieu extérieur. L'architecture moléculaire de la zone rappelle les jonctions synaptiques et s'appuie sur de nombreuses protéines d'adhésion qui sont liées aux canaux sodium et potassium (dans la région juxtaparanodale). La composante radiale contient la protéine de jonction serrée, claudin-11/oligodendrocyte specific protein (OSP). Caspr : contactin-associated protein, Cntn : Contactin, Cx 29 : connexin 29, KCh : canaux potassium, MAG : myelin associated glycoprotein, MOBP : myelin oligodendrocyte basic protein, NaCh : canaux sodium voltage-dépendants, NECL : nectin-like protein/synCAM, NF155/186 : neurofascin 155/186.

(D'après, Werner et Jahn, 2010)

1. Les internodes

(Pour revue, Quarles et al., 1999; Arroyo et Scherer, 2000; Laule et al., 2007; Thaxton et Bhat, 2009)

Les segments de myéline compacte sont organisés en *internodes*, dont l'aspect ultrastructural est multilamellaire, spiralé et périodique. Chaque OL peut former plusieurs internodes avec de nombreux axones et le nombre de ces internodes est régulé par les axones eux-mêmes. Quand la myélinisation est initiée, tous les axones ont la même taille, cependant, les OLs ont la capacité de créer des internodes de myéline de taille et d'épaisseur adaptées au futur diamètre de l'axone.

La bicouche myélinique est formée par l'apposition d'unités répétées, les *lignes denses majeures* (MDLs) formées par la fusion des faces cytoplasmiques de la membrane plasmique d'un OL, alternant avec les espaces extracellulaires entre deux prolongements d'OLs adjacents, les *lignes intrapériodiques* (IPLs). L'IPL est donc une extension de l'espace extracellulaire, remplie d'eau et qui représente, avec l'espace intracellulaire, environ 40% du poids total de la myéline. La myéline a une périodicité d'environ 150 à 160 angströms (**Figure 32**).

Les MDLs ont leur cytoplasme enchâssé dans une boucle. Ces terminaisons de la gaine au niveau des nœuds s'appellent les *boucles latérales*. Les boucles forment des complexes membranaires avec l'axolemmes (membrane entourant l'axone), appelés *bandes transversales*, tandis que la myéline de la région internodale est séparée des axones par un pont extracellulaire nommé *espace périaxonale*. Les bandes transversales présentent une structure en hélice qui permet de joindre la myéline à l'axolemmes. Une série de lignes denses intralamellaires disposées radialement aux MDLs dans une zone le long de la myéline compacte du SNC, est appelé *composant radial*. Cette bande pourrait correspondre à une zone de jonctions serrées et contient la *protéine spécifique des OLs/claudine-11* (claudine-11 /OSP), mais sa fonction reste encore mal connue.

Au sein des internodes, on retrouve des incisions transversales appelées *incisures de Schmidt-Lantermann*. Ce sont des structures dans lesquelles les surfaces cytoplasmiques de la gaine de myéline ne se sont pas compactées pour former la MDL, et qui contiennent donc le cytoplasme des cellules gliales. Bien qu'assez rares dans le SNC, ces structures sont abondantes dans le SNP. Ces inclusions de cytoplasme sont présentes dans chaque couche de myéline et peuvent être visualisées dans le feuillet myélinique déroulé comme des tubes de cytoplasme similaires aux tubes constituant les boucles latérales.

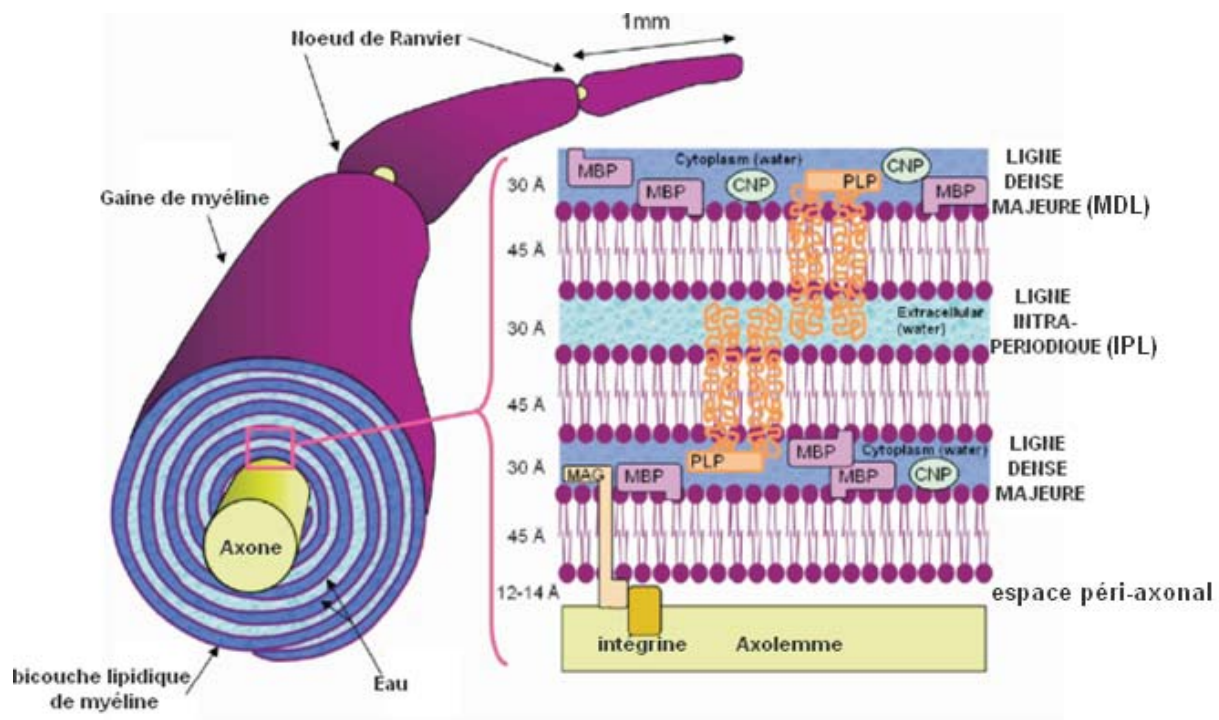


Figure 32. Structure de la gaine de myéline.

Schématisation des enroulements des feuillets myéliniques du SNC autour d'un axone et détail de la couche de myéline incluant la protéine basique de la myéline (MBP), la protéolipoprotéine (PLP), la cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP) et la glycoprotéine associée à la myéline (MAG). (D'après, Laule et al., 2007)

2. Les paranodes et juxtaparanodes

(Pour revue, Arroyo et Scherer, 2000; Laule et al., 2007; Thaxton et Bhat, 2009)

Plusieurs boucles paranodales sont finement accolées les unes avec les autres par des jonctions serrées formées par la protéine *claudine-11/OSP* et communiquent les unes avec les autres par des jonctions communicantes formées par deux hémicanaux composés de *connexines 32*. Elles forment ainsi le *juxtaparanode* puis le *paranode* par leur contact avec l'axone.

Au niveau des paranodes, le bord latéral de la gaine de myéline entoure l'axone, formant la *jonction axogliale*. Les boucles paranodales de la gaine de myéline contiennent des alignements de larges particules et une double rangée de petites particules au niveau de l'axolemme. Ces particules permettent la connexion de la boucle terminale à l'axone. Les jonctions axogliales fonctionnent comme des jonctions serrées, en formant des jonctions intercellulaires qui empêchent la diffusion des ions et petites molécules. Chaque boucle paranodale est étroitement liée à l'axolemme par des interactions entre protéines spécifiques :

la *neurofascine 155* du côté de la membrane gliale et la *protéine Caspr* (Contactin associated protein ou paranodine) du côté axonale. Le domaine cytoplasmique de Caspr contient un site de liaison pour la *protéine 4.1*, qui peut alors se lier au cytosquelette d'actine. Le domaine cytoplasmique de Caspr contient également un site de liaison SH3, qui permettrait à la protéine de participer aux voies de signalisation au sein de l'axone (**Figure 33**).

Au niveau juxtaparanodale, la distribution des particules correspond à la distribution des *canaux potassiques*, *Kv1.1* et *Kv1.2* et leur *sous-unité associée $\beta 2$* . Bien que ces canaux soient cachés sous la gaine de myéline, ils ont une fonction physiologique importante d'atténuation de l'excitabilité des fibres myélinisées. Une protéine homologue de Caspr, appelée *Caspr2* a été identifiée dans le cerveau humain et de souris. Caspr2 établit un complexe avec les canaux potassiques, pour lequel la *protéine PDZ* (contenue dans son domaine intracellulaire) sert probablement d'intermédiaire. Bien que les connexions transcellulaires entre la membrane axonale juxtaparanodale et la gaine de myéline n'aient pas été décrites, il est possible que Caspr2 ait un partenaire de liaison, comme décrit pour Caspr (**Figure 33**).

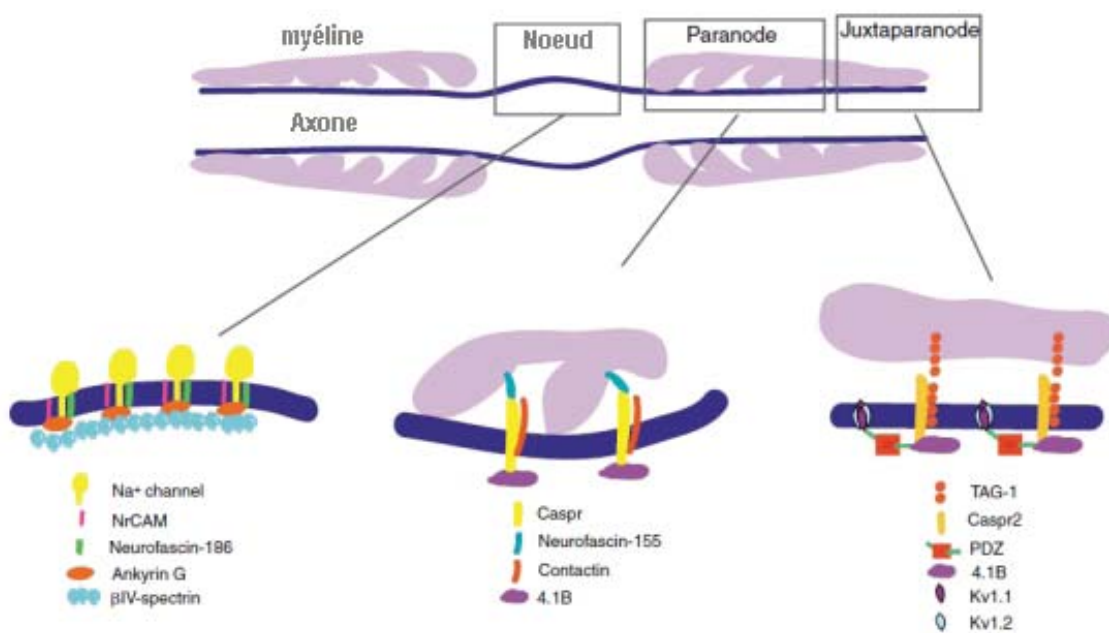


Figure 33. Composition moléculaire des domaines situés au niveau du nœud de Ranvier.

Les composants du nœud de Ranvier comprennent la neurofascine-186, NrCAM et les canaux voltages dépendants sodium (Na⁺), qui sont attachés à un complexe contenant l'ankyrin G et la βIV-spectrin. Les paranodes contiennent un complexe Caspr/contactin/4.1B à la membrane axonale, qui se lie à la neurofascine-155 de la boucle paranodale. Le complexe multi-protéique du juxtaparanode contient un complexe *cis*Caspr2/TAG-1 qui interagit avec 4.1B et une protéine contenant un domaine PDZ, associée à 2 types de canaux potassiques, Kv1.1 et Kv1.2. Ce complexe est lié, via une interaction *trans* avec TAG-1, à la membrane gliale. (D'après, Simons et Trajkovic, 2006)

3. Les nœuds de Ranvier

(Pour revue, Quarles et al., 1999; Laule et al., 2007; Thaxton et Bhat, 2009)

L'axone n'est pas continuellement enroulé dans la gaine de myéline, entre chaque internode, il est localement démyélinisé à des sites nommés *nœuds de Ranvier*. La taille d'un nœud de Ranvier est d'environ 1 μm et la distance séparant deux nœuds est d'environ 1-2 mm, mais croît avec le diamètre de la fibre. Dans les fibres nerveuses myélinisées, les nœuds de Ranvier sont les seuls endroits où le transfert d'ions a lieu (à l'exception des échanges potassium au niveau des juxtaparanodes). La densité des canaux ioniques y est particulièrement importante : tandis qu'il y a seulement quelques dizaines de canaux sodiques par μm^2 sur un axone non myélinisé, il y a une concentration de centaines de canaux sur une même surface, au niveau de chaque nœud de Ranvier, dans un axone myélinisé. Au niveau des nœuds de Ranvier, la diminution de la capacité de la membrane induit une augmentation locale des PA et l'augmentation de la résistance permet leur propagation sur de plus longues distances. Dans ces conditions, et parce que tous les canaux sodiques sont concentrés dans les nœuds de Ranvier, ils sont le lieu de naissance des PA dont la propagation s'effectue en « sautant » d'un nœud à l'autre, ainsi appelée *conduction saltatoire*.

Les nœuds de Ranvier sont également riches en molécules d'adhésion transmembranaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines (*neurofascine 186* et *Nr-cell adhesion molecule* (Nr-CAM)) et fixées à des protéines interagissant avec le cytosquelette (*ankyrine G* et *$\beta\text{IV-spectrine}$*) (**Figure 33**). Ces molécules d'adhésion transmembranaires sont en contact avec un réseau de molécules de la matrice extracellulaire se localisant spécifiquement aux nœuds de Ranvier (brevican/gliomédine, versican, tenascine-R et phosphocan en particulier). L'ensemble de ces protéines forme un complexe macromoléculaire spécifique du nœud de Ranvier, impliqué dans le regroupement des canaux sodiques au niveau des nœuds, permettant la conduction des PA et la communication de l'axone avec le milieu extracellulaire et l'OL.

C. Composition de la myéline du SNC

La myéline est composée d'une bicouche comprenant environ 80% de lipides et 20% de protéines spécifiques. Sa composition est particulière puisqu'elle est pauvre en eau et plus riche en lipides que les autres membranes cytoplasmiques. Les protéines enchâssées dans la membrane contribuent à son ultrastructure (Laule et al., 2007).

1. Les lipides de la myéline

(Pour revue, Quarles et al., 1999)

La myéline est hautement riche en lipides, notamment en *cholestérol*, *phospholipides*, *glycosphingolipides* (ou *galactocérébrosides*) et *plasmalogènes*. Bien qu'il n'existe pas de lipides spécifiques de la myéline, le galactocérébroside est le plus typique de la myéline. A l'exception du développement précoce, la concentration de cérébroside dans le cerveau est directement proportionnelle à la quantité de myéline présente. Au moins un cinquième des galactolipides totaux de la myéline sont des sulfatides. A priori, les glycolipides de la myéline, comme dans les autres membranes, sont préférentiellement localisés dans la membrane extracellulaire face à la IPL. A cause de la spécificité et de la quantité significative des galactocérébrosides dans les OLs et la myéline, on a longtemps pensé, à tort, qu'ils étaient essentiels pour le maintien et la formation de la myéline. Il semblerait que les sulfatides soient importants pour l'établissement correct des interactions axone-OLs dans la région paranodale. Les galactocérébrosides et surtout les sulfatides ont, semble-t-il, également un rôle important dans la différenciation des OLs.

En plus des cérébrosides/sulfatides, les principaux lipides de la myéline sont le cholestérol et les phospholipides. Il apparaît que la myéline contient beaucoup plus de molécules de cholestérol qu'aucun autre lipide, bien qu'en terme de poids, la quantité de galactolipides est comparable et les phospholipides totaux sont plus abondants. Une caractéristique des phospholipides est la présence d'*éthanolamine plasmogène*, un glycérophospholipide contenant un groupe alcényl éther, particulièrement sensible aux réactions oxydantes. Ils constituent ainsi une classe particulière des lipides membranaires ayant des propriétés anti-oxydantes endogènes, protégeant ainsi les cellules contre le stress oxydant. Le cholestérol est plus présent sur la face extracellulaire de la membrane myélinique, tandis que l'éthanolamine plasmogène est localisé plus asymétriquement à la partie cytoplasmique de la bicouche.

La *lécithine* est également un composant majeur de la myéline tandis que la *sphingomyéline* a une participation mineure. Non seulement la composition en lipides de la myéline est hautement caractéristique mais la composition en acides gras de beaucoup de ces acteurs lipidiques est également particulièrement distincte.

Il existe également des variations régionales, par exemple, la myéline de la ME a un ratio lipides/protéines plus élevé que la myéline du cerveau, pour une même espèce.

Enfin, s'ajoutent aux lipides de la myéline cités précédemment, d'autres lipides mineurs, notamment, les *polyphosphoinositides*, quelques *esters d'acide gras de galactocérobroside* et des *galactosyldiglycérides*. La myéline des mammifères contient également des *gangliosides*, le principal étant le *monosialoganglioside* (GM1). La myéline de certaines espèces, dont l'Homme, contient en plus un nouveau ganglioside majeur, le *sialosylgalactosylcéramide* (GM4).

2. Les protéines de la myéline

(Pour revue, Quarles et al., 1999; Laule et al., 2007; Jahn et al., 2009)

Récemment des études ont révélé l'existence de nombreuses protéines jusqu'alors inconnues entrant dans la composition de la myéline à plus de 65%, et que les protéines connues ne représentent en fait que 35% des protéines de la myéline (Jahn et al., 2009) (**Figure 34**).

La composition protéique de la myéline du SNC est comparable à celle des autres membranes cérébrales avec deux protéines qui prédominent clairement, MBP et PLP, qui constituent respectivement 17% et 8 % des protéines totales de la myéline. PLP est une membrane hydrophobe à 4 domaines transmembranaires et permet principalement le maintien de la structure myélinique (*nous reviendrons en détail sur cette protéine PLP et ses implications fonctionnelles dans le Chapitre III*). Quant à MBP, elle est localisée à la surface cytoplasmique de la myéline compacte, dans les MDLs. Elle forme des dimères et participerait à la stabilisation des MDLs dans la myéline du SNC, en interagissant avec des lipides chargés négativement.

Beaucoup d'autres protéines et glycoprotéines sont présentes mais en quantités beaucoup plus réduites, notamment :

- la *2',3'-cyclic nucléotide 3'-phosphodiesterase* (CNP), qui représente 4% des protéines totales et qui jouerait un rôle trophique important dans les OLs et les axones sous-jacents.
- la *glycoprotéine associée à la myéline* (MAG), qui représente 1% des protéines de la myéline et qui, associée à la surface de l'axolemmme, a une fonction de guidance axonale et de maintien structurel.
- la *MOG* confinée à la surface cytoplasmique interne de la myéline et dont le rôle précis reste inconnu, mais pourrait être important dans la définition de l'intégrité structurale de la gaine de myéline.
- la *claudine 11/OSP*, permettant la formation de jonctions serrées.

- la *Sirtuine 2 (SIRT2)*, *déacétylase NAD⁺-dépendante*, qui interviendrait dans l'équilibre d'acétylation des protéines myéliniques et permettrait ainsi indirectement une stabilisation de la structure microtubulaire axonale.

On retrouve également toutes les protéines présentes au niveau du nœud de Ranvier, du paranode et juxtaparanode (*cf. Chapitre II.B. Organisation de la myéline*).

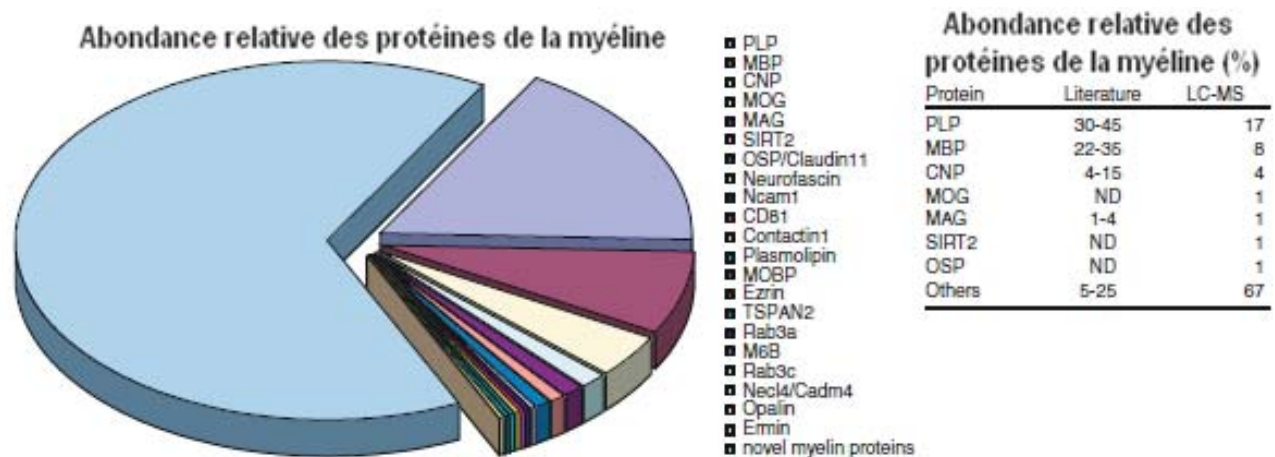


Figure 34. Abondance relative des protéines de la myéline.

On peut voir dans le diagramme circulaire (à gauche), que les protéines connues de la myéline constituent moins de 40% des protéines totales de la myéline. Les protéines mitochondriales n'ont pas été considérées. Dans le tableau (à droite), les valeurs usuelles de la littérature sont comparées aux valeurs récemment obtenues par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). (D'après, Jahn et al., 2009)

3. Assemblage intracellulaire de la myéline et intégration membranaire

Les protéines de la myéline sont incorporées aux OLs dans des vésicules cytoplasmiques, afin d'être transférées au niveau de l'expansion de la membrane plasmique. Certaines de ces vésicules enrichies en cholestérol et galactolipides sont appelées « *lipid rafts* » et semblent particulièrement adaptées au transport et à l'intégration des protéines hydrophobes dans la membrane myélinique telles que PLP ou MBP (Jahn et al., 2009).

D. Formation de la myéline au cours du développement

La myélinisation réalisée par les OLs matures est un processus hautement régulé de façon spatio-temporelle. La myélinisation consiste en l'enroulement spiralé des prolongements membranaires des OLs autour d'un segment axonale, puis l'extrusion du cytoplasme, suivi de la compaction des membranes accolées (Simons et Trajkovic, 2006).

Chez l'Homme, la myélinisation débute selon un gradient caudo-rostral, dans la ME puis le tronc cérébral et le cervelet. Ces régions achèvent leur myélinisation vers la naissance, à l'exception des faisceaux pyramidaux qui termineront leur myélinisation dans les premiers mois post-nataux. Elle se poursuit ensuite dans les hémisphères cérébraux selon un gradient rostro-caudal. L'expression de MBP dans le cerveau, témoin d'un départ de myélinisation, est visible à 18 semaines de gestation chez l'Homme. Le développement des OLs devient très intense lors du second trimestre de gestation et progresse au-delà de la naissance. La myélinisation chez l'Homme sera importante au cours des deux premières années de vie, puis s'étalera sur plusieurs dizaine d'années. Malgré la fin de la myélinisation, certains précurseurs des OLs sont également toujours présents dans le cerveau adulte (Jakovcevski et al., 2009).

Chez la souris, la myélinisation débute également selon un gradient caudo-rostral dans la ME, puis le tronc cérébral et le cervelet, et se poursuit dans les hémisphères cérébraux selon un gradient rostro-caudal. La myélinisation du cerveau murin ne débute qu'en post-natal et l'expression de MBP dans le cerveau n'est visible qu'à partir du 3^{ème} jour après la naissance. La myélinisation s'achève ensuite en seulement trois semaines.

Ce décalage de myélinisation entre cerveau murin et humain, avec un processus de myélinisation plus précoce et beaucoup plus long chez l'homme que chez la souris, s'explique par les différences anatomiques et fonctionnelles entre le SNC de l'homme et de la souris. Par exemple, les zones néocorticales du cerveau humain sont absentes chez la souris, et inversement les bulbes olfactifs sont particulièrement développés chez l'animal.

Plusieurs voies de signalisation et mécanismes ont été identifiés pour leur implication dans la transmission de signaux activant et/ou inhibant la différenciation des OLs (*cf. Chapitre I. B. (4) Les oligodendrocytes*) et le processus de myélinisation. Il semblerait que la *voie de signalisation PI-3 kinase/Akt/mTOR* soit requise pour promouvoir la myélinisation (Fancy et al., 2011).

Le déclenchement du processus de myélinisation dans le SNC en développement pourrait être déterminé, plus par le degré de différenciation neuronale, que le timing d'un programme de différenciation oligodendrocytaire intrinsèque. Un signal essentiel pour le déclenchement de la myélinisation semble provenir de l'activité électrique des neurones eux-mêmes. Les PA permettent une libération d'ATP et d'adénosine, qui peuvent influencer les communications

neurone-glie. Dans le SNC, l'adénosine inhibe la prolifération des OPCs ou des OLs. Elle déclenche la libération du *facteur inhibiteur leucémique* (LIF) depuis les astrocytes, ce qui induit la maturation des OLs et la myélinisation.

Bien que l'activité électrique des neurones dans le SNC soit un facteur pro-myélinisant essentiel, d'autres changements induits de façon indirecte par cette activité électrique et l'activation de canaux ioniques, au sein de l'axone, semblent participer à la formation de la myéline. Par exemple, pendant le développement, toutes les fibres nerveuses en croissance expriment la *molécule d'adhésion cellulaire neuronale polysialylée* (PSA-NCAM) qui empêche les interactions cellulaires. Quand cette forme de NCAM est sous-régulée, comme dans un neurone électriquement actif, la myélinisation peut avoir lieu. Une autre molécule, la protéine transmembranaire, *LINGO-1*, exprimée dans les neurones et les OLs, influence, de manière inhibitrice, la maturation des OLs et la myélinisation. La perte de fonction de cette protéine dans les OLs mène à une augmentation de la myélinisation tandis que sa surexpression inhibe la formation de la myéline (Rosenberg et al., 2007; Bradl et Lassmann, 2010).

E. Rôle de la myéline

1. Conduction de l'influx nerveux

(Pour revue, Laule et al., 2007; Nave, 2010)

La myéline se comporte comme un isolant électrique pour les neurones et permet d'augmenter la vitesse de conduction des PA de 10 à 100 fois comparé à la transmission sur des fibres non myélinisées (*cf. Chapitre I. C. (1.a) Les fibres nociceptives*). Cette caractéristique a une importance cruciale du fait de l'importance des vitesses de conduction dans les fonctions neuronales motrices, sensorielles et comportementales. La myéline des internodes agit comme un isolant de haute résistance électrique et de faible conductance. Les canaux sodium voltage-dépendants localisés au niveau des nœuds de Ranvier servent d'intermédiaires aux PA qui se diffusent alors d'un nœud de Ranvier à l'autre. La conduction saltatoire résultante est alors beaucoup plus rapide et exige moins de dépense énergétique qu'une conduction continue opérée par les canaux sodiques uniformément répartis le long des axones non myélinisés. L'acquisition d'une telle fonction liée à l'apparition de la myéline chez les vertébrés au cours de l'évolution leur a conféré un avantage énergétique notable, leur permettant de développer des réponses sensori-motrices rapides et des mouvements complexes coordonnés.

2. Protection de l'axone et interactions cellulaires

(Pour revue, Simons et Trajkovic, 2006; Rosenberg et al., 2007; Nave, 2010)

La myéline a également un rôle important de protection de l'axone. Plusieurs arguments défendent cette hypothèse : d'une part, l'influence positive de la myélinisation observée sur le diamètre axonal, d'autre part la dégénérescence axonale progressive visible en cas de pathologies affectant la myéline chez l'homme, comme la sclérose en plaques ou les pathologies génétiques affectant la SB du SNC (leucodystrophies), ou du SNP (neuropathies hypomyélinisantes de Charcot-Marie-Tooth).

La communication réciproque entre l'axone et l'OL est importante dès la période développementale précoce. Au cours de la formation du SNC, les neurones interviendraient dans la régulation du nombre et dans la différenciation des OPCs pour assurer une régulation du timing et de la localisation de la myélinisation. L'axone interagirait précocement à proximité puis en contact avec les OLs en sécrétant des facteurs interagissant avec des récepteurs spécifiques présents à la surface membranaire des OPCs et des OLs (*cf. Chapitre I. B. (4) les oligodendrocytes*). De plus, l'axone exprime à l'axolemmme des signaux attractifs ou répulsifs pour les OLs, certains interagissant avec des molécules de la matrice extra-cellulaire. Enfin, l'activité électrique axonale débutante aurait un effet attractif et promyélinisant sur les OLs.

De même, les OLs myélinisants sont capables de produire des molécules reconnaissant l'axone et pouvant favoriser la croissance du cône axonal puis le maintien de l'intégrité axonale. Une fois, la myélinisation achevée, certaines molécules oligodendrocytaires pourraient jouer un rôle essentiel dans le maintien d'interactions entre l'axone et la myéline, en particulier des protéines d'adhésion cellulaire spécifiquement réparties le long des internodes, des juxtaparanodes, des paranodes ou des nœuds de Ranvier. De plus certaines protéines de la matrice extracellulaire, péri-axonales, au niveau des nœuds, semblent utiles à la mise en place puis au maintien des interactions axones-OLs (Simons et Trotter, 2007; Bekku et al., 2009). Des protéoglycans sécrétés, tels que versican, phosphocan et brevican, et des protéines de la matrice, telles que le récepteur tenascine ou Bradl1, ont été localisées au niveau du nœud de Ranvier et seraient capables de créer un réseau péri-neuronal organisé.

En plus de ces fonctions de conduction, la myéline est également impliquée dans la régulation du transport axonal, la modification de pH et la régulation des volumes de fluides et de la composition ionique. Ces fonctions soulignent l'étroite association entre la myéline et l'axone.

F. Pathologies neurologiques et anomalies de la substance blanche

Nous distinguerons :

- les pathologies primitives de la SB d'origine génétique, comme les leucodystrophies (LD), ou acquises, comme la sclérose en plaque,
- des pathologies neurologiques avec atteinte cognitive et/ou comportementale dans lesquelles un dysfonctionnement de la SB a été proposé.

1. Pathologies avec atteinte primitive de la substance blanche

a. Pathologies génétiques : les leucodystrophies

Les LD ont initialement été reconnues et classées grâce à l'analyse clinique et neuropathologique, puis biochimique grâce à l'identification de déficits enzymatiques importants pour le métabolisme des lipides, en particulier dans les peroxysomes (adrénoleucodystrophie liée à l'X,...) et les lysosomes (LD métachromatique,...). Les techniques d'IRM (Schiffmann et van der Knaap, 2009), et d'analyse des conductions nerveuses intracérébrales (potentiels évoqués, PE) ont transformé la reconnaissance de ces affections en permettant d'objectiver, du vivant du malade, l'anomalie de la SB. Il est classique de reconnaître deux grands mécanismes physiopathologiques : la dysmyélinisation lorsque les processus pathologiques interfèrent avec le développement de la myéline aboutissant parfois à une paucité de la myéline (hypomyélinisation) et la démyélinisation quand ceux-ci aboutissent à une destruction précoce de la myéline (Boespflug-Tanguy et al., 2008). Avec ce même souci de classification, les auteurs distinguent les anomalies génétiques touchant primitivement les cellules gliales (LD primitives), des pathologies axonales ou neurodégénératives primitives qui lorsqu'elles sont précoces, débutant avant la myélinisation, sont responsables secondairement d'anomalies de myélinisation (LD secondaires). C'est le cas de certaines paraplégies spastiques héréditaires (SPG15, 21, IAHSP...) (de Bot et al., 2010), de maladies métaboliques touchant primitivement le neurone et l'axone (dystrophie neuro-axonale, céréoïde lipofuscinose,...) Il est parfois difficile de distinguer ces deux entités, le terme de *leucoencéphalopathie* est alors utilisé pour désigner les pathologies affectant de façon simultanée la SB et la SG (gangliosidose infantile GM1 GM2...).

En pratique clinique, les caractéristiques cliniques, radiologiques, neurophysiologiques et évolutives des LD ont permis de définir deux grandes catégories, une pouvant faire suspecter un processus hypomyélinisant, désignée par extension « LD hypomyélinisantes », l'autre un processus plutôt démyélinisant, désignées par extension « LD démyélinisantes» (**Tableau 2**):

Type	Nom de la pathologie	Protéine / gène	Apparition de la maladie	Symptômes	Caractéristiques IRM	
Leucodystrophies hypomyélinisantes	Maladie de Pelizaeus-Merzbacher	PLP-DM20 / <i>PLP1</i>	Infantile	Nystagmus, choréo-athétose, ataxie, potentiels évoqués multimodaux altérés	Hypomyélinisation diffuse	
	Paraplégie spastique de type 2	PLP-DM20 / <i>PLP1</i>	2-10 ans	Nystagmus, choréo-athétose, ataxie, potentiels évoqués multimodaux altérés	Hypomyélinisation diffuse	
	Pathologie PMD-like	GJA12 (connexine 47) / <i>GJA12</i>	< 1 an	Nystagmus, ataxie, dysarthrie, potentiels évoqués multimodaux altérés	Hypomyélinisation diffuse	
Leucodystrophies démyélinisantes	Leucodystrophies vacuolaires	Maladie d'Alexander	Infantile < 2 ans Juvénile 2-12 ans Adulte > 12ans	Mégaencéphalie, épisodes induits par le stress, signes bulbaires	Démyélinisation	
		Leucoencéphalopathie mégaencéphalique	Protéine MLC1 / <i>MLC1</i>	< 10 ans	Mégaencéphalie, épisodes induits par le stress	Démyélinisation diffuse
		Syndrome CACH (Childhood ataxia with central hypomyelination) / VWM (Vanishing white matter)	Euaryotic inititation factor 2B / <i>EIF2B</i>	Congénitale Infantile précoce < 2ans Infantile tardif 2-5 ans Juvénile/adulte > 5 ans	Episodes induits par le stress, glaucome, cataracte, contractures, dysfonctionnement ovarien	Démyélinisation diffuse, cavitations
	Leucodystrophies démyélinisantes	Leucodystrophie métachromatique	Arylsulfatase A (ARSA), sulfatides, saposin B / <i>ARSA</i>	Infantile 6 mois-3 ans Juvénile 3-16 ans Adulte > 16 ans	Neuropathie démyélinisée, augmentation protéines liquide céphalo-rachidien	Démyélinisation prédominante de l'aire postérieure et corps calleux
		Maladie de Krabbe	Galactocerebroside β-galatosidase (GALC) / <i>GALC</i>	Infantile < 6 mois Juvénile 6 mois-10 ans Adulte > 10 ans	Neuropathie démyélinisée, cellules globoïdes	Démyélinisation région péri-ventriculaire
		Adrénoleucodystrophie	Acides gras saturés à très longue chaîne / <i>ABCD1</i>	5-15 ans > 10 ans	Insuffisance surrénale	Démyélinisation corps calleux, régions pariéto-occipitales
		Maladie de Canavan	N-acetylaspartate (NAA), aspartoacylase (ASPA) / <i>ASPA</i>	Infantile 3-6 mois Juvénile 6 mois-10 ans	Macroencéphalie progressive, leucoencéphalopathie spongiforme	Démyélinisation régions subcorticales

Tableau 2. Tableau récapitulatif des pathologies incluses dans les deux grandes catégories de leucodystrophies.

(D'après, Boespflug-Tanguy et al., 2008)

(1) *Les leucodystrophies hypomyélinisantes*

Les LD hypomyélinisantes se caractérisent par un défaut de formation de la myéline, entraînant une quantité de myéline insuffisante dans le SNC. Des anomalies de production de la myéline par les OLs et des défauts de cohésion de la membrane myélinique entraînent des signes de détérioration neurologique.

En IRM, la SB présente un aspect immature (normo signal ou isosignal T1/hypersignal T2) reconnu par un signal anormal diffus de la SB. En électrophysiologie, les conceptions nerveuses centrales étudiées par l'enregistrement des potentiels évoqués sont habituellement altérées précocement, dès le plus jeune âge.

L'âge d'apparition de la pathologie semble principalement lié à la sévérité de la dysmyélinisation et à la progression de la maladie vers une souffrance axonale. Les LD hypomyélinisantes ont été classées en fonction du gène impliqué. Les LD hypomyélinisantes les plus fréquemment reconnues sont liées à des mutations du gène *PLP1* codant pour les protéines majeures de la myéline du SNC, PLP et DM20, regroupées sous le terme de *PLP-pathies* comprenant la *PMD* et la *SPG2* (Cailloux et al., 2000; Inoue, 2005). Nous reviendrons en détail ultérieurement sur la description de ces pathologies en lien avec ce travail de thèse.

D'autres gènes ont plus récemment été impliqués dans des phénotypes de type *PMD*, *PMD-like* ou *SPG* comme le gène *GJA12*, qui code la connexine 47, spécifique des OLs formant des jonctions avec la connexine 43 présente à la surface des astrocytes.

L'association de la LD hypomyélinisante à certains signes cliniques ou IRM ont permis d'individualiser plusieurs phénotypes :

- l'association à une hypomyélinisation périphérique (neuropathie démyélinisante) et à une cataracte congénitale a été décrite sous le terme de *syndrome HCC* (Hypomyelination with Congenital Cataract). Les études moléculaires ont permis de montrer l'existence de formes avec cataracte tardive voire absente (Biancheri et al., 2011).
- l'association à une hypodontie, à une hypomyélinisation périphérique et un hypogonadisme hypogonadotrope a été définie sous le terme de *syndrome 4H* que l'on a rapproché des formes avec simple hypodontie, puis au *syndrome TACH* (Tremor, Ataxia with Central Hypomyelination). La caractéristique clinique et IRM de ces formes est l'apparition après l'âge de 4 ans d'une ataxie progressive avec atrophie cérébelleuse (Vázquez-López et al., 2008; Sato et al., 2011). Les gènes codant pour les sous-unités A et B de la polymérase III ont été récemment impliqués dans ces 3 syndromes (Bernard et al., 2011).

- l'association à une neuropathie périphérique hypomyélinisante sévère avec troubles de la motricité digestive et des anomalies de pigmentation de la peau a été rapprochée des syndromes avec troubles de maturation des crêtes neurales (PCWH : peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease) (Verheij et al., 2006; Parthey et al., 2012).

Un grand nombre de ces LD hypomyélinisantes sont actuellement encore sans anomalies moléculaires identifiées du fait de la diversité des facteurs impliqués dans le processus et le maintien de la myélinisation.

(2) Les leucodystrophies démyélinisantes

Les LD démyélinisantes se caractérisent par une formation initiale effective de la myéline, de façon plus ou moins normale, suivi d'une perte ou de remaniements de cette myéline. En IRM, l'aspect typique est celui d'une atteinte démyélinisante (hyposignal T1/hypersignal T2) symétrique, d'étendue variable. En électrophysiologie, les conceptions nerveuses s'altèrent progressivement sur les enregistrements successifs des potentiels évoqués.

La classification proposée tient compte du type d'anomalies de la SB (confluentes, bilatérales, symétriques dans la plupart des maladies génétiques de la SB), de leur localisation prédominante (frontale, ME...), de la présence de lésions cavitaires ou kystiques (hyposignal FLAIR comparable à celui du LCR), d'une éventuelle prise de contraste péri-lésionnelle, de la présence de calcifications, de pics caractéristiques en spectroRMN, d'une anomalie des noyaux gris centraux (hypersignal T2 dans les mitochondriopathies, ...).

On distingue classiquement :

▪ Les Leucodystrophies vacuolaires

Les LD vacuolaires correspondent à un groupe de LD pour lesquelles certaines zones de la myéline ont évolué vers un aspect liquidien. Les gènes impliqués sont exprimés sur les astrocytes (gène *GFAP*, gène *MLC1* pour megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1) (Brenner et al., 2001; Mignot et al., 2004), ou de façon ubiquitaire (gènes codant pour les 5 sous-unités du facteur d'initiation de la traduction eIF2B). Dans le dernier cas, bien que la protéine soit ubiquitaire, les mutations semblent affecter plus particulièrement la maturation et l'activité astrocytaire dans le SNC ainsi que les fonctions gonadiques.

▪ Les leucodystrophies démyélinisantes avec marqueurs biochimiques

Cette catégorie comprend entre autres, deux LD d'origine métabolique de transmission autosomique récessive appartenant au groupe des maladies lysosomales : la *leucodystrophie métachromatique* (LDM) de type 1 ou de type 2, suivant le type d'enzyme en déficit,

respectivement l'arylsulfatase A ou la saposine B, et *la maladie de Krabbe de type 1 ou de type 2*, avec un déficit respectivement en β -galactocérébrosidase ou en saposine A. Dans la LDM, les déficits entraînent d'une part un défaut de galactosylceramidase (GalC), glycosphingolipide essentiel pour le renouvellement de la gaine de myéline et d'autre part, une accumulation de sulfatides responsables d'un processus inflammatoire dans le SNC et le SNP. Dans la maladie de Krabbe, l'atteinte de la myéline serait liée à l'accumulation excessive d'un métabolite secondaire appelé psychosine, toxique pour la SB.

On trouve également parmi les LD démyélinisantes avec marqueurs biochimiques, une pathologie peroxysomale, l'*adrénoleucodystrophie* qui est une pathologie de transmission récessive liée à l'X, caractérisée par l'accumulation d'acides gras saturés à très longue chaîne par défaut de dégradation due à une mutation sur le gène ABCD1. A noter que les autres désordres peroxysomaux peuvent également induire une atteinte de la SB, souvent moins diffuse.

Enfin, dans cette catégorie de LD, il existe une pathologie d'origine métabolique, la *maladie de Canavan* caractérisée par un déficit en aspartoacylase, enzyme hydrolysant le N-acétyl-aspartate (NAA), métabolite important pour l'homéostasie neuronale, en aspartate et acétate.

▪ ***Les leucodystrophies démyélinisantes sans marqueur biochimique***

La *leucoencéphalopathie avec atteinte du tronc cérébral et de la ME et élévation des lactates* est une entité récemment décrite de transmission autosomique récessive, liée à des mutations de l'aspartyl-tRNA synthétase mitochondriale codée par le gène *DARS2*.

Une autre entité est la *leucodystrophie démyélinisante autosomique dominante de l'adulte* due à des duplications de la région génomique de la lamine B1, filament intermédiaire nucléaire.

b. Pathologie acquise: le cas de la sclérose en plaques

La *sclérose en plaques* (SEP) est une des maladies neurologiques les plus communes, diagnostiquée chez le jeune adulte. Elle se caractérise par une démyélinisation inflammatoire associée à une perte axonale dans le SNC, responsables de signes neurologiques variés. Cette pathologie peut altérer l'axone autant que la myéline elle-même, conférant un pronostic plus grave (Medana et Esiri, 2003). Les symptômes de la SEP se manifestent classiquement entre 20 et 40 ans et se caractérisent par des hémiparésies, une perte visuelle, une diplopie (vision dédoublée), un nystagmus (mouvement d'oscillation involontaire et saccadé du globe oculaire), une ataxie (manque de coordination fine des mouvements volontaires), une spasticité (étirement rapide d'un muscle qui entraîne sa contraction réflexe pendant un certain temps), des troubles de la marche, une incontinence et d'importantes douleurs (Paty et Ebers,

1999). Nous nous limiterons à résumer ici les éléments connus dans cette pathologie concernant la douleur et les troubles cognitifs.

(1) Sclérose en plaques et douleur

La douleur est un des symptômes les plus fréquemment traités dans la SEP. On distingue : les douleurs neuropathiques centrales continues (douleurs dysesthésiques aux extrémités), les douleurs neuropathiques centrales intermittentes (névralgie du trijumeau), les douleurs musculo-squelettiques (douleur en bas du dos) ou encore les douleurs neuropathiques mixtes ou non-neuropathiques (maux de tête) (Solaro et Uccelli, 2011). Les douleurs neuropathiques centrales sont les plus fréquemment retrouvées (prévalence d'environ 50%). Les signes classiques de cette douleur tels que l'hyperalgésie et l'allodynie sont rapportés chez 38% des patients atteints. Dans l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle animal de SEP, des anomalies sensitives, comme l'hyperalgésie thermique (Aicher et al., 2004) et l'allodynie tactile et au froid (Olechowski et al., 2009) ont également été rapportées. Dans ce modèle, une augmentation des astrocytes et de la réactivité microgliale/macrophage dans la corne dorsale de la ME a été identifiée, suggérant que l'inflammation et l'astrogliose seraient des médiateurs du comportement douloureux de type neuropathique observé chez ces animaux. Dans un autre modèle expérimental de SEP, le modèle TMEV (pour Theiler's murine encephalomyelitis virus), les souris présentent également une hyperalgésie thermique et une allodynie mécanique (Lynch et al., 2008). Cependant, aucune étude sur l'homme n'a encore reliée la nature et la localisation de la douleur à des dommages spécifiques du SNC (Solaro et Uccelli, 2011). Le traitement des symptômes douloureux de la SEP reste encore un challenge car bien qu'efficace pour traiter certains types de douleurs neuropathiques centrales, les traitements par antidépresseurs tricycliques et antiépileptiques présentent des effets secondaires notables, qui souvent empêchent l'utilisation de ces drogues à leur potentiel maximum.

(2) Sclérose en plaques et cognition

En plus de la compréhension de la nature complexe des douleurs développées par les patients atteints de SEP, des études récentes focalisées sur les fonctions supérieures ont permis de mieux appréhender cette pathologie comme source d'altérations cognitives et émotionnelles, rappelant les concepts du neurologue Jean-Martin Charcot dans les années 1870 (Charcot, 1877). Le profil des anomalies cognitives rencontrées dans la SEP comprend des déficits des fonctions exécutives, de l'attention soutenue, de la récupération mnésique, et des fonctions visuo-spatiales (Filley, 2001). Il a également été suggéré une anomalie d'encodage de la

mémoire, qui pourrait être reliée à la démyélinisation de l'alveus, une couche cellulaire de l'hippocampe contenant les axones des cellules pyramidales dirigées vers la *fimbria* ou le *subiculum*. D'autres syndromes neurocomportementaux ont également été rapportés comme l'aphasie et une déconnexion calleuse (déconnexion cérébrale à l'origine d'une asynergie entre les deux hémisphères), et des désordres psychiatriques (euphorie, rires et pleurs pathologiques) (Filley, 2001; Fields, 2008). La source de ces altérations cognitives est vraisemblablement due à la détérioration de la SB, puisque plusieurs études IRM ont mis en évidence quelques corrélations entre l'importance des altérations de la SB et le degré de perte cognitive. Dans la SEP, alors que la myéline intracorticale est affectée et que les lésions corticales peuvent être évaluées, la démyélinisation des faisceaux larges de SB demeure la neuropathologie de la SEP plus directement impliquée dans la perte cognitive et la démence (Penny et al., 2010). La SEP altère un volume plus important de SB dans les faisceaux de fibres larges que dans le cortex, et le profil neuropsychologique de la perte cognitive chez les patients suggère que la démyélinisation de ces faisceaux est probablement le principal déterminant des dysfonctionnements neurocomportementaux (Filley, 2001).

2. Pathologies neurodégénératives impliquant une atteinte de la substance blanche

La SB occupe environ la moitié du cerveau, mais son rôle dans la médiation des hautes fonctions cérébrales est moins reconnu que celui de la SG. Cependant, ces dernières décennies, des progrès majeurs ont été faits dans la compréhension de l'importance de la SB et des OLs comme composants essentiels des systèmes cérébraux impliqués dans les désordres psychiatriques, et notamment l'aspect cognitif et émotionnel. Des théories ont été émises selon lesquelles un large éventail de désordres neuro-comportementaux d'apparition précoce ou tardive au cours de la vie – depuis l'autisme à la maladie d'Alzheimer – pourrait être relié à une formation incomplète de la myéline avant la maturité, ou à une dégradation de la SB avec la sénescence (Filley, 1998; Bartzokis, 2005). Nous citerons quelques pathologies neurodégénératives dans lesquelles des anomalies de la SB ont été impliquées

a. La schizophrénie

(Pour revue, Karoutzou et al., 2008; Herring et Konradi, 2011)

La schizophrénie est une pathologie mentale grave et invalidante qui affecte environ 1% de la population générale. Les symptômes positifs de la pathologie incluent des hallucinations auditives, une pensée désorganisée et des délires, tandis que les symptômes négatifs impliquent une perte de volonté, une anhédonie (incapacité à ressentir des émotions

positives), un affect émoussé et une apathie. D'autres domaines sont également souvent altérés comme l'attention, la mémoire, la motivation, la pensée et le langage, la sociabilité et la régulation de l'humeur. Cette pathologie résulterait d'un dysfonctionnement des réseaux de traitement neuronaux du cerveau (Harrison et Weinberger, 2005). Les dysfonctionnements cognitifs retrouvés chez les patients pourraient être le résultat d'une déconnexion fonctionnelle des circuits neuronaux au niveau local mais s'étendant également à de nombreuses aires cérébrales (Frith, 1996). Les patients présentant des troubles de la SB souffrent d'importants symptômes psychotiques (Hyde et al., 1992). Les anomalies de la myéline retrouvées dans les études *post-mortem* de cerveaux de patients atteints de schizophrénie, ont permis d'évoquer le rôle d'anomalies de la SB dans cette déconnexion, en particulier entre différentes régions cérébrales (Hakak et al., 2001; Uranova et al., 2001). De nombreuses études se sont donc intéressées depuis dix ans au rôle de la SB, de la myéline ou des OLs dans la physiopathologie de la schizophrénie. L'hypothèse est que le syndrome de déconnexion observé dans la pathologie pourrait être en partie lié à des anomalies de myélinisation, menant à des défauts d'isolement électriques des axones et par conséquent, à un transfert anormal des courants électriques le long de ces axones et des informations parcourant les diverses aires cérébrales.

Des anomalies biochimiques ou de la structure de la SB ont été détectées chez des patients schizophrènes grâce à de multiples techniques d'imagerie cérébrale (IRM classique, imagerie par tenseur de diffusion, imagerie par transfert de magnétisation...). Des analyses moléculaires de cerveaux de patients atteints de schizophrénie ont mis en évidence des anomalies liées à la fonction oligodendrocytaire et à la myélinisation dans les régions frontales (McCullumsmith et al., 2007). De plus, une réduction importante du nombre d'OLs périneuronaux dans des sous-couches du CPF de patients atteints de schizophrénie a été rapportée (Vostrikov et al., 2007, 2008).

Des données récentes suggèrent un rôle majeur des OLs dans la modulation de la neurotransmission, ce qui pourrait être une donnée pertinente dans le cas de la schizophrénie. Des troubles comportementaux de type schizophrénique ont été rapportés dans plusieurs modèles murins impliquant un dysfonctionnement des OLs ou de la myéline :

- La souris transgénique présentant une altération des transporteurs de la dopamine et des récepteurs D1 suite au blocage induit du récepteur de la signalisation NRG1 (erbB) dans les OLs, montre une réduction du nombre d'embranchements des prolongements des OLs, une diminution de l'épaisseur de la myéline, et un ralentissement de la vitesse de conduction nerveuse dans le corps calleux (Roy et al., 2007). Cette souris développe des altérations comportementales comparables à celles retrouvées chez les patients schizophrènes ou atteints

de troubles bipolaires, notamment une altération de la réponse sociale à la nouveauté mais sans anomalie de l'apprentissage spatial et de la mémoire de travail (O'Tuathaigh et al., 2007). Le mécanisme responsable de l'interruption de la fonction dopaminergique suite à un dysfonctionnement des interactions neurono-oligodendrocytaire *erbB* dépendante est actuellement inconnu. En régulant la vitesse de conduction et la plasticité synaptique, la myéline pourrait influencer le transfert de l'information (Fields, 2008).

- La souris transgénique obtenue après inactivation du gène codant la protéine de la myéline MAG, présente des anomalies motrices telles que des difficultés d'équilibre sur un cylindre en rotation, une hyperactivité et une anomalie de réflexe d'extension des pattes arrières (Pan et al., 2005), sans altération de l'apprentissage et de la mémoire spatiale (Montag et al., 1994). La MAG, située dans la myéline à l'interface avec l'axone, est également impliquée dans l'initiation de la myélinisation du SNC (Montag et al., 1994) et la survie des OLs (Weiss et al., 2000).

- La souris traitée à la cuprizone, un chélateur du cuivre, présente une importante démyélinisation transitoire du SNC par altération du fonctionnement des OLs. La cuprizone provoque ainsi une diminution des niveaux de MBP dans le cortex cérébral, ainsi qu'une importante prolifération microgliale et astrocytaire, et peu d'OLs myélinisants aux sites démyélinisés (Zhang et al., 2008a). Des études récentes ont montré d'importants changements neurobiologiques et comportementaux chez ces souris exposées à la cuprizone, notamment une augmentation du comportement d'escalade et une diminution du réflexe de sursaut suggérant une augmentation de l'activité du SNC et un défaut de contrôle sensorimoteur. Une diminution de la sociabilité associée à une augmentation du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé et des altérations de la mémoire spatiale de travail ont également été mis en évidence (Hibbits et al., 2009). Une augmentation des taux de dopamine et une diminution de ceux de NA ont été retrouvés dans le CPF de ces souris (Xu et al., 2009). Ce modèle a permis d'évaluer l'efficacité de traitements antipsychotiques, non seulement sur les symptômes mais également sur les anomalies neuropathologiques de la SB. En effet, la quetiapine, un antipsychotique atypique fréquemment utilisé pour le traitement des patients atteints de schizophrénie et d'autres désordres psychotiques, a montré une efficacité, en administration chronique, sur la détérioration de la myéline dans le cortex cérébral et a permis d'améliorer la mémoire de travail spatiale des souris traitées (Zhang et al., 2008a; Xu et al., 2010).

Ces résultats chez l'animal suggèrent que certaines drogues antipsychotiques ou d'autres catégories de traitements utilisés dans le cadre de la schizophrénie pourraient présenter un effet bénéfique via une amélioration des altérations de la SB. Ils soulignent également

l'intérêt de tester ces drogues sur les symptômes comportementaux observés dans les maladies primitives de la SB.

b. La maladie d'Alzheimer

Le rôle potentiel d'anomalies de la SB dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer, la démence la plus fréquente chez les personnes âgées reste encore hypothétique (Chui et al., 2006; Kuczynski et al., 2008). La pathologie corticale de la maladie d'Alzheimer – plaques amyloïdes, dégénérescence neurofibrillaire et perte neuronale et synaptique – pourrait être initiée par une détérioration de la SB. Bartzokis en fait son hypothèse, dans « *le modèle de la myéline* », suggérant que la démence corticale de la maladie d'Alzheimer se superpose au vieillissement normal suite à la vulnérabilité sélective de la SB (Bartzokis, 2011). Selon ce modèle, la myéline et les OLs sont hautement sensibles au vieillissement et à des facteurs associés tels que l'ischémie et les traumatismes cérébraux ; et les processus normaux de réparation sont inefficaces face à ces altérations. De ce fait, une perte neuronale et synaptique se développe dans les régions corticales, et les caractéristiques neuropathologiques de la maladie de d'Alzheimer – plaques et dégénérescence – seraient les sous-produits des processus homéostatiques de réparation de la myéline (Bartzokis, 2011). Enfin, l'échec des stratégies thérapeutiques de « *nettoyage amyloïde* » pour améliorer de manière significative l'aspect cognitif de la pathologie (Hardy, 2009), suggère que d'autres mécanismes sont certainement en cause.

c. La maladie de Parkinson

(Pour revue, Bohnen et Albin, 2011)

Des lésions de la SB sont communément observées dans des études d'imagerie chez les personnes âgées saines (Murray et al., 2010). Ces lésions de SB liées à l'âge résulteraient en partie d'une dégénérescence progressive des petits vaisseaux profonds de la SB. Elles sont associées à des pertes d'équilibre, de mobilité et des déficits cognitifs (Gunning-Dixon et Raz, 2000; Novak et al., 2009), notamment des déficits d'attention, des fonctions exécutives et de la vitesse de traitement des informations (Tullberg et al., 2004; Prins et al., 2005). Ces symptômes étant retrouvés dans la maladie de Parkinson, des lésions de la SB ont été proposées comme contribuant à leur apparition.

Un déclin cognitif est fréquemment retrouvé chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, avec une prévalence ponctuelle estimée jusqu'à 40% pour les démences et plus de 60% pour les dysfonctionnements exécutifs. Une équipe a démontré, grâce à des analyses IRM, que l'existence de lésions de la SB double le risque d'apparition de démences chez les

patients atteints de la maladie de Parkinson (Beyer et al., 2006). Une étude récente a comparé les profils neuropsychologiques de patients parkinsoniens, avec ou sans lésions vasculaires observées à l'IRM et pour lesquels une dénervation dopaminergique nigrostriatale a été confirmée. Les patients avec des lésions de la SB associées ont des performances diminuées aux tests d'évaluation des fonctions exécutives et d'attention. Aucune étude n'a pu démontrer un lien entre dénervation dopaminergique nigrostriatale et lésions de la SB chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Cependant, des données suggèrent que l'augmentation des lésions de SB est associée à une détérioration des performances cognitive indépendamment du degré de dénervation dopaminergique nigrostriatale (Zarzhovsky, 2010).

d. Conclusion

(Pour revue, Fields, 2008)

Avec l'augmentation des connaissances sur les maladies psychiatriques, des anomalies de la SB ont été associées à des pathologies telles que la schizophrénie, les troubles bipolaires, les troubles obsessionnels compulsifs, le stress post-traumatique, l'autisme et les désordres d'hyperactivité/déficit d'attention, même si le rôle précis des modifications de la SB dans ces pathologies reste incertain. Il devient clair que la myélinisation continue jusqu'à l'âge adulte et même après (notamment dans les aires corticales) et pourrait contribuer à la plasticité des fonctions cognitives, l'apprentissage et la mémoire. Des perturbations dans les processus moléculaires menant à la myélinisation des axones résulteraient en des dysfonctionnements axonaux, une conduction anormale et par conséquent l'altération du transfert d'informations à travers les différentes aires cérébrales (Fields, 2008). Il est possible que la santé de l'axone et son dysfonctionnement contribuent à la physiopathologie de nombre de pathologies psychiatriques, et la survie de l'axone est dépendante de l'étroite association axones / glie environnante (Nave et Trapp, 2008; Nave, 2010). Une question importante est de savoir si les anomalies d'expression des gènes de la myéline ou de la structure de la SB sont les causes directes de ces désordres ou une conséquence secondaire du fonctionnement anormal de la SG. La mise en évidence de facteurs de risque génétiques impliquant les gènes de la myéline et de changements d'expression des transcrits ARNm liés à la myéline en l'absence de modifications neuronales dans plusieurs pathologies psychiatriques, telles que la schizophrénie (Hakak et al., 2001; Tkachev et al., 2003; Georgieva et al., 2006), les troubles bipolaires (Tkachev et al., 2003), la dépression (Tkachev et al., 2003; Aston et al., 2005) et les troubles obsessionnels compulsifs (Stewart et al., 2007), suggèrent que la SB est une cause contribuant à de nombreux désordres affectant l'humeur et la cognition. De plus, des manipulations expérimentales sélectives, dans les OLs, de gènes régulant le développement

glial et la myélinisation peuvent provoquer des modifications comportementales mimant les symptômes schizophréniques (Roy et al., 2007).

Bien que le dysfonctionnement synaptique soit la base cellulaire de nombre de maladies mentales, des interruptions de la connectivité fonctionnelle entre les régions cérébrales distantes peuvent altérer le cheminement des informations en association avec un éventail de processus neurologiques. Nous avons vu que des défauts d'isolement de la myéline peuvent mener à des anomalies de la fonction cognitive chez 40% des patients atteints de sclérose en plaques (Kujala et al., 1997). Le déclin cognitif apparaissant avec l'âge est également concomitant à des changements discrets de l'intégrité de la SB (Gootjes et al., 2004). Ceci suggère qu'une capacité cognitive réduite, une désorganisation de la pensée, des désordres de l'humeur ou des hallucinations, accompagnant les maladies psychiatriques, pourraient résulter d'un ralentissement ou d'une désynchronisation des influx de conduction nerveuse entre les régions corticales distantes. Les faisceaux myélinisés dans le cerveau ne connectent pas seulement les aires de SG mais également renforcent cette connectivité en augmentant la vitesse de conduction nerveuse dans les axones les rejoignant. Le transfert de l'information de la SG, manifesté par des événements synaptiques tels que des libérations de neurotransmetteurs et le mécanisme de potentialisation à long terme (Mesulam, 2000), est complété par un transfert d'information de la SB, qui permet le fonctionnement rapide et efficace d'un réseau neuronal distribué (Mesulam, 1990; Filley, 2001). La coopération des deux compartiments est donc essentielle pour le bon fonctionnement des comportements hautement évolués du cerveau humain. Si les troubles de la SB sont responsables de désordres neurocomportementaux dans les pathologies neurodégénératives, alors nous pouvons penser que ces symptômes neurocomportementaux pourraient être retrouvés dans des atteintes primitives de la SB telles que les leucodystrophies.

III. LE GÈNE DES PROTÉOLIPOPROTÉINES (*PLP1*) ET SES IMPLICATIONS FONCTIONNELLES

Les protéolipoprotéines, font partie des protéines majeures de la membrane myélinique et sont codées par le gène des protéolipoprotéines, nommé *Plp1* chez la souris et *PLP1* chez l'homme.

A. Famille phylogénique des protéolipoprotéines

(Pour revue, Griffiths et al., 1998a; Greer et Lees, 2002)

Les protéolipoprotéines comprenant les isoformes PLP et DM20 sont des protéines hautement conservées au cours de l'évolution, exprimées essentiellement dans la myéline du SNC. Elles appartiennent à la famille des lipophilines, protéines transmembranaires, basiques, hydrophobes, sans peptide signal clivable en N-terminal, et dont certaines subissent une N-glycosylation.

Le gène *PLP1*, acquis il y a plusieurs millions d'années et codant pour les protéolipoprotéines, est présent en copie unique chez les tétrapodes (amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères) et en copie double chez la grenouille. Les mammifères, les reptiles et les oiseaux expriment les deux isoformes, PLP et DM20, dans la myéline du SNC alors que les amphibiens n'expriment que DM20 couplé à P0, autre protéine de la myéline n'appartenant pas à la famille des lipophilines, présente de façon majoritaire uniquement dans le nerf périphérique chez l'homme et les mammifères.

B. Structure du gène *PLP1*

(Pour revue, Griffiths et al., 1998a; Greer et Lees, 2002)

Le gène *PLP1* codant pour les isoformes PLP et DM20, a été localisé sur le chromosome X par Willard et Riordan (Willard et Riordan, 1985) puis en Xq22.2 par Mattei et al. Il est très conservé chez les mammifères. Le gène *PLP1* contient 7 exons et son unité transcriptionnelle s'étend sur environ 17 kb. L'exon 1 contient des éléments de la région promotrice 5'UTR, les deux sites alternatifs d'initiation de la transcription et le codon initiateur de la traduction. L'exon 3 contient un site interne d'épissage alternatif et l'exon 7 contient, suite à la région codante, une région 3'UTR riche en séquences de polyadénylation (**Figure 35**).

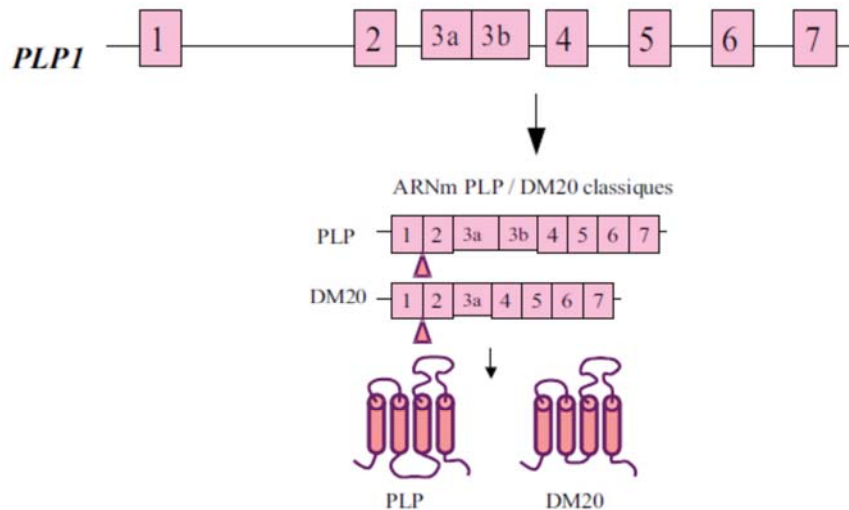


Figure 35. Structure du gène *PLP1* donnant lieu à 2 isoformes PLP et DM20.

Suite à l'épissage alternatif de l'exon 3, 2 transcrits alternatifs, PLP et DM20, sont produits. Le site d'initiation de la traduction se trouve en position 3' de l'exon 1 (flèche). Deux isoformes protéiques, PLP et DM20, différant de 35 acides aminés au niveau de la boucle intracellulaire, sont produites.

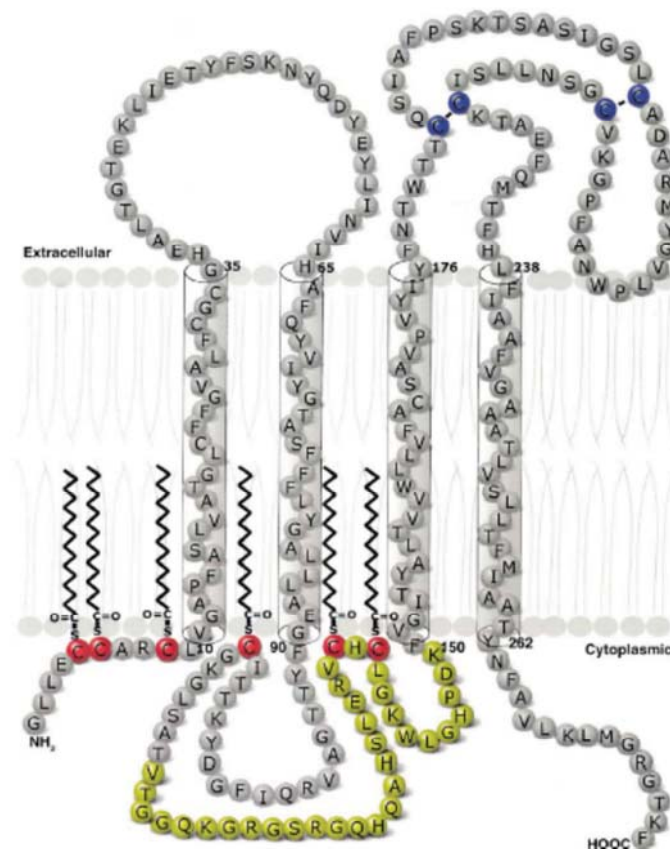


Figure 36. Structure des isoformes, PLP et DM20, dans la membrane myélinique.

PLP est une protéine à 4 domaines transmembranaires en hélice α , avec les terminaisons NH₂ et COOH terminales localisées sur la face cytoplasmique de la membrane. La région de PLP absente de DM20 (résidus 116-150) est identifiée en jaune. Les cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures de PLP (résidus 183-227 et 200-219) sont identifiées en bleu foncé.

(D'après, Greer et Lees, 2002)

C. Produits d'expression du gène *PLP1*

1. Structure et synthèse de PLP/DM20

(Pour revue, Greer et Lees, 2002)

Par épissage alternatif de l'exon 3, *PLP1* produit deux transcrits alternatifs aboutissant aux deux isoformes protéiques PLP et DM20 (**Figure 35**). Ces protéines ont été initialement mises en évidence dans des échantillons de cerveau par Folch et Lees en 1951 (Folch et Lees, 1951). Il s'agit de protéines transmembranaires composées de quatre domaines hydrophobes, possédant deux boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire. Leurs extrémités N et C-terminales sont intra-cytoplasmiques (Greer et Lees, 2002). Ces deux protéines partagent une séquence identique mais diffèrent dans leur composition par la présence de 35 acides aminés supplémentaires dans PLP, issus de la traduction de l'exon 3b, au niveau de la boucle intra-cytoplasmique, chargés positivement, donnant respectivement une protéine PLP de 277 acides aminés et une protéine DM20 de 242 acides aminés (**Figure 36**). Leur poids moléculaire est respectivement de 25,4 kDa et de 20,7 kDa. La séquence protéique de PLP/DM20 est extrêmement conservée entre espèces : l'homologie est de 100% entre l'homme, le rat, la souris, de 98-99% avec le chat, le chien et le lapin et de 97% avec le bœuf. Elle reste de 85% avec les oiseaux et les amphibiens. La demi-vie des protéolipoprotéines serait de 24 heures chez la souris.

Les protéolipoprotéines sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) où se forment également les deux ponts disulfures. La formation du pont disulfure proximal dans le RER semble nécessaire à une bonne intégration membranaire de PLP/DM20. Les protéolipoprotéines sont ensuite transférées dans l'appareil de Golgi où elles subissent une modification post-traductionnelle par la palmitoylation. Celle-ci semble favoriser un bon acheminement des protéolipoprotéines à la membrane myélinique et est nécessaire aux propriétés adhésives de PLP/DM20.

2. Distribution spatiale de l'expression des protéolipoprotéines

PLP et DM20 sont majoritairement exprimées dans la myéline du SNC, avec une expression majoritaire de l'isoforme PLP dans le SNC adulte. Une expression des protéolipoprotéines a également été mise en évidence dans de nombreux autres tissus, comme les cellules de Schwann, les cellules satellites du SNP, les neurones, le thymus, le cœur, les cellules amniotiques, les fibroblastes, le trophoblaste, les testicules et les cellules interdigitées du système immunitaires. Il semblerait que dans ces tissus, l'isoforme DM20 soit majoritaire. Le rôle des protéolipoprotéines dans ces tissus reste méconnu.

3. Expression des protéolipoprotéines au cours du développement

(Pour revue, Wight et Dobretsova, 2004)

L'expression des protéolipoprotéines au cours du développement du SNC coïncide avec la période de myélinisation dans le SNC. Chez l'Homme, dans la ME, les transcrits PLP sont observés dès quatre semaines de grossesse dans la région péri-épendymaire antérieure, tandis que l'expression protéique survient vers 12 semaines de grossesse. Dans le cerveau humain, l'expression des transcrits a été observée dans la région périventriculaire à 17 semaines de grossesse (Jakovcevski et al., 2009). L'expression des protéines apparaît à partir de 24 semaines de grossesse dans la SB périventriculaire puis évolue vers la périphérie. Elle s'achève par les fibres sous-corticales vers l'âge de 2 mois post-natal (Iai et al., 1997). Chez l'Homme, on retrouve une expression plus précoce de l'isoforme DM20 par rapport à l'isoforme PLP. A l'âge adulte, l'isoforme PLP devient majoritaire (Ikenaka et al., 1992). Cette évolution du ratio PLP/DM20 au cours du développement semble très conservée chez les mammifères. A l'âge adulte, quand la myélinisation est effective, la valeur du ratio PLP/DM20 est estimée à 3 : 1 (Spörkel et al., 2002).

Chez la souris, l'expression des transcrits débute dès le stade embryonnaire à E10 dans le tronc cérébral, puis évolue selon un gradient caudo-rostral et atteint un maximum vers le 8^{ème} jour post-natal, moment du pic de myélinisation. Elle reste élevée jusqu'au 20^{ème} jour post-natal, puis diminue modérément dans le SNC adulte. Dans le cerveau murin, l'expression évolue également selon un gradient antéro-postérieur avec une expression maximale retardée à 30 jours post-natal dans les régions frontales. L'expression protéique dans le cerveau murin est maximale au 20^{ème} jour post-natal, puis elle se stabilise dans le cerveau adulte à une valeur de l'ordre de 80% du taux d'expression maximale observé. Précocement dans le développement murin, le transcrit DM20 serait exprimé dès le stade embryonnaire E10 dans la moelle et le tronc cérébral et E18 dans le nerf optique dans les progéniteurs des OLs, alors que l'isoforme PLP, marqueur des OLs matures, apparaît au 1^{er} jour post-natal, peu avant la myélinisation (Timsit et al., 1992; Dickinson et al., 1996).

4. Régulation de l'expression de PLP/DM20

(Pour revue, Wight et Dobretsova, 2004)

Au cours de la différenciation des OLs et de la myélinisation, l'expression de *PLP1* est fortement régulée de façon spatio-temporelle par des facteurs de transcription, parmi lesquels certains ont un site de liaison identifié dans la région promotrice de *PLP1*. C'est le cas des facteurs de transcription MyT1 et MyT2 (« Myelin transcription factor 1 » et 2), de YY1, de l'hétérodimère THRβ/PPAR (récepteur aux hormones thyroïdiennes β/« peroxisomal

proliferator activated receptor »), de Gtx/Nkx6.2 (facteur de transcription à homéodomaine) ou encore Nkx2.2.

L'intron 1 de *PLP1* contient plusieurs éléments régulateurs qui interviendraient dans le contrôle de l'expression cellule-spécifique de *PLP1*. Un élément régulateur positif de 86 paires de bases, appelé ASE (antisilencer/enhancer element), et deux éléments régulateurs négatifs ont tout d'abord été mis en évidence dans l'intron 1 murin. Les éléments régulateurs négatifs réprimerait l'expression de *PLP1* dans les cellules non gliales. L'ASE permettrait dans les OLs de réprimer ces éléments de régulation négative, permettant ainsi l'expression de *PLP1* (Li et al., 2002).

L'expression de chaque isoforme PLP ou DM20 est également finement régulée au niveau transcriptionnel. L'intron 3 et l'exon 3 contiennent des éléments régulateurs appelés ISE (intronic splicing enhancer) ou ESE (exonic splicing enhancer) agissant sur l'expression différentielle des deux ARNm PLP et DM20.

D. Fonctions biologiques de PLP/DM20

(Pour revue, Campagnoni et Skoff, 2001; Greer et Lees, 2002; Inoue, 2005)

L'étude des mécanismes physiopathologiques liés aux mutations du gène *PLP1* chez l'homme et chez les modèles animaux a permis de mieux appréhender les rôles des protéolipoprotéines. Des études ont montré que la présence de PLP/DM20 n'est pas indispensable à la formation de la myéline mais permet une compaction correcte (Klugmann et al., 1997; Garbern et al., 1997). Par leur intégration transmembranaire, PLP/DM20 seraient impliqués dans la *compaction de la myéline* par apposition des faces extracellulaires des membranes myéliniques au niveau des lignes intrapériodiques. Les OLs matures exprimant normalement PLP/DM20 semblent être favorisés dans le SNC (Yool et al., 2001). Les souris transgéniques avec inactivation de *Plp1* présentent une myéline instable, confirmant le rôle de PLP/DM20 dans la compaction et la *stabilisation de la gaine de myéline*. De plus, ces souris développent une dégénérescence axonale suggérant un rôle essentiel de PLP dans la *survie de l'axone et dans les interactions axones-OLs* (Garbern et al., 1997, 2002; Griffiths et al., 1998a; Wang et al., 2008). Enfin, l'implication indirecte de PLP/DM20 dans l'inclusion membranaire de SIRT2, une déacétylase NAD⁺ dépendante qui permettrait de maintenir la déacétylation de certaines protéines assurant la stabilité des microtubules, renforce l'idée d'interactions rapprochées entre l'axone et l'OL (Werner et al., 2007). Ces interactions pourraient passer par une *fonction neuroprotectrice* de PLP/DM20 dans le SNC des mammifères, indépendant de sa fonction de compaction de la myéline (Wang et al., 2008).

De plus, chez l'Homme, les mutations null du gène *PLP1* mènent au développement de neuropathies périphériques démyélinisantes, suggérant également un rôle de PLP/DM20 dans le *maintien de la membrane myéline et la survie axonale dans le SNP* (Garbern et al., 1997, 1999).

Certaines études ont avancé l'hypothèse que PLP/DM20 pourraient avoir un *rôle de canal*. Cette hypothèse est basée sur (1) la conformation à quatre domaines transmembranaires de ces protéines qui se rapproche de celle d'autres protéines canaux, (2) leur capacité à former des hexamères de type hémicanal et (3) sur le fait que la présence de ces protéines induirait des modifications voltage-dépendantes dans le cerveau (Díaz et al., 1990; Knapp, 1996).

Une expression des protéolipoprotéines dans les neurones et leur *implication dans le fonctionnement neuronal* a également été rapportée dans plusieurs études (Ikenaka et al., 1992; Miller et al., 2009). PLP/DM20 agiraient dans les neurones sur le fonctionnement de certains types de canaux potassiques calcium dépendants impliqués dans la régulation de l'intensité des potentiels d'action et dont l'absence ou la sous-expression sont connues pour induire des épilepsie ou des ataxies (Mayer et al., 2009).

De plus, une possible action de PLP au niveau de la membrane mitochondriale et par conséquent, dans le métabolisme énergétique du SNC, a été récemment évoquée par les résultats observés chez les animaux sur-exprimant *Plp1*. L'hypothèse selon laquelle PLP, par sa conformation transmembranaire et ses motifs permettant son intégration aux membranes mitochondriales, pourrait agir comme régulateur du potentiel de membrane mitochondriale par la formation de pores, reste cependant encore à démontrer (Hüttemann et al., 2009; Hogan et al., 2009).

Un *rôle mitogène* de PLP/DM20 a été proposé, suite aux données selon lesquelles : (1) un environnement exprimant les protéolipoprotéines possède la capacité de favoriser la croissance des OLs murins in vitro et in vivo (Bartlett et al., 1988; Lachapelle et al., 1991); (2) l'induction dose-dépendante par l'expression du gène *Plp1* induit la sécrétion de facteurs actifs sur la gliogénèse (Nakao et al., 1995); (3) un peptide C-terminal PLP/DM20 de 74 acides aminés, sécrété dans le milieu extracellulaire, a une implication dose-dépendante directe, sur la prolifération des OLs murins au cours du développement embryonnaire (Yamada et al., 1999).

Les protéolipoprotéines participeraient également au fonctionnement d'un complexe tripartite de signalisation α_v -intégrine-calrétinine-PLP, dans les OLs qui, stimulé par le glutamate, favoriserait la migration des OPCs (Gudz et al., 2002, 2006).

Bien que la fonction propre de chacune des deux isoformes, PLP et DM20, ne soit pas réellement connue, chacune semble jouer un rôle distinct et non substituable par l'autre

isoforme (Spörkel et al., 2002). L'épissage alternatif PLP/DM20 étant très conservé et régulé chez les vertébrés supérieurs, on suppose un rôle essentiel de chacune des isoformes (Ikenaka et al., 1992; Gow et al., 1997). DM20, dont l'expression est plus précoce au cours du développement, pourrait intervenir dans les processus de prolifération et maturation des OLs alors que les deux isoformes pourraient intervenir en association dans le fonctionnement des OLs matures (McLaughlin et al., 2002).

Des travaux récents ont permis d'identifier l'existence de deux nouveaux exons dans l'intron 1 du gène *PLP1* humain, qui mèneraient à l'expression d'ARNm et d'isoformes protéiques supplémentaires, principalement exprimés dans les neurones au lieu des OLs (Sarret et al., 2010). Ces nouvelles isoformes neuronales de PLP sont détectées dès le développement fœtal de façon plus précoce dans la ME que dans le cerveau, et leur expression concomitante est spécifique de l'espèce humaine. L'analyse différentielle de l'expression des isoformes PLP et DM20 a révélé une évolution identique à celle des isoformes classiques avec une expression précoce de DM20 chez le fœtus, suivie d'une augmentation d'expression de PLP qui devient majoritaire au cours de la myélinisation. Comme la protéine PLP classique, les nouvelles isoformes semblent adressées à la membrane plasmique. Les résultats de cette étude suggèrent que, chez l'Homme, PLP pourrait avoir des fonctions non seulement dans les OLs mais également dans les neurones, et pourrait être ainsi impliquée par ce biais dans la communication axono-gliale. De plus, cette expression neuronale du gène *PLP1* pourrait expliquer les dysfonctionnements neuronaux chez les patients présentant des mutations de *PLP1* (Sarret et al., 2010).

E. Pathologies liées au gène PLP1

1. Pathologies affectant l'homme : les PLP-pathies

(Pour revue, Garbern et Hobson, 1999; Inoue, 2005)

Il s'agit d'affection liées à l'X affectant plus sévèrement les garçons hémizygotes pour la mutation que les filles hétérozygotes. Un large spectre phénotypique regroupé sous le terme PLP-pathies, a été décrit. Il s'étend de la forme la plus sévère dite congénitale de *PMD*, à la forme la plus modérée, de *SPG2* observée chez les mères transmettrices (**Figure 37**). Une corrélation génotype-phénotype a été ensuite mise en évidence.

En 1885, un physicien allemand du nom de Friedrich Pelizaeus a identifié une famille où les individus mâles manifestaient un nystagmus, une paraplégie spastique, une ataxie et un retard développemental. Dans les années 1900, un pathologiste allemand, Ludwig Merzbacher, examine cette famille et déduit que la pathologie est liée à l'X et transmise de façon récessive. L'examen du cerveau d'un patient permet déjà d'identifier une importante perte myélinique

dans la SB. Dans le siècle qui suit, de nouveaux cas et de nouvelles études neuropathologiques ont été décrites mais peu de choses sont encore connues sur la biochimie et les bases génétiques de la pathologie. Peu après 1985, des mutations du gène *PLP1* sont retrouvées chez des patients PMD et dans des modèles animaux de la pathologie. La découverte du gène responsable de l'émergence de la maladie et l'utilisation de modèles animaux ont permis d'énormes progrès dans les études sur PMD, notamment :

- (1) Les bases génétiques sont clarifiées. Différentes mutations du gène *PLP1* sont découvertes et les corrélations génotype-phénotype dévoilent un large spectre de manifestations cliniques associées spécifiquement à des mutations de *PLP1*.
- (2) Les progrès en neuroimagerie, avec la technologie par résonance magnétique, ont permis de préciser les diagnostics de la pathologie.
- (3) Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie par lesquels les mutations de *PLP1* aboutissent à une dysmyélinisation du SNC, mais également du rôle physiologique de *PLP1* dans le développement et le maintien de la myéline du SNC.

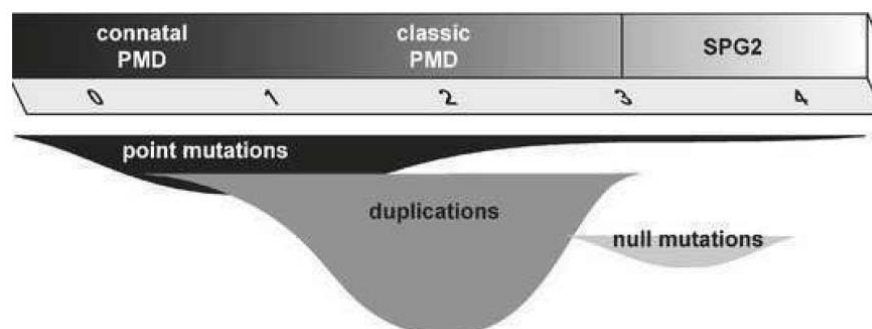


Figure 37. Classification clinique des pathologies dysmyélinisantes liées à *PLP1*.

Le rectangle du haut montre une classification en contraste avec les nouvelles sous-classes proposées par O. Boespflug-Tanguy représentées par des chiffres. En dessous, le schéma présente la distribution typique des mutations de *PLP1* associées à chaque phénotype. On peut noter la non spécificité de chaque mutation pour un phénotype donné. (D'après, Inoue, 2005)

a. La maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD)

Les caractéristiques neuropathologiques communes de la PMD sont :

- une diminution de la quantité ou une réduction de la taille des gaines de myéline dans la SB, qui sont habituellement plus importantes dans les régions périventriculaires latérales que dans les régions sous-corticales.
- Une structure du corps cellulaire des neurones et de leurs prolongements assez bien conservée.

- Une apparence mouchetée de la SB liée à la présence irrégulière d'îlots myéliniques, surtout périventriculaires, faits d'une myéline prenant une coloration normale mais anormalement fine (pathologie soudanophile).
- Un nombre réduit d'OLs matures.

Généralement, le degré de dysmyélinisation est corrélé à la sévérité clinique. En 1970, Seitelberger a proposé une classification basée sur les examens cliniques et neuropathologiques en 2 sous-types, distinguant une forme sévère dite congénitale d'une forme plus modérée dite classique. Cette classification ne rend pas compte du caractère toujours très précoce de cette maladie (avant 3 mois) et de sa grande variabilité d'expression avec un continuum clinique allant des patients sans aucune acquisition neuromotrice décédant souvent dans la première décennie (forme 0), aux patients avec acquisition d'une marche avec aide et une durée de vie normale (forme 3).

Cliniquement, la maladie de PMD se caractérise par une évolutivité des signes neurologiques.

- Au cours des premières années de vie, les signes neurologiques sont le reflet du retard et de la paucité de la myélinisation dans les faisceaux moteurs. Ils évoluent donc en suivant la dynamique de la myélinisation normale. Le retard moteur, sous forme d'une grande hypotonie, est donc présent dès les premiers jours de vie fréquemment associé à des difficultés de succion avec reflux gastro-œsophagien. Dans les formes sévères, les difficultés de coordination des muscles pharyngo-laryngés sont parfois responsables d'un bruit laryngé (stridor) qui disparaît en général en 3 à 6 mois. Il apparaît, en général, entre 3 semaines et 2 mois, des mouvements oculaires anormaux (nystagmus) du fait du trouble de myélinisation des faisceaux oculomoteurs du tronc cérébral et du cervelet, puis entre 6 et 12 mois une instabilité de la tête (ataxie) et du tronc associée à des grands mouvements des membres (choréoathétose) du fait du trouble de myélinisation des faisceaux moteurs cortico-spinaux. A partir de l'âge de 2-3 ans, le nystagmus et l'ataxie diminuent, parallèlement à l'amélioration des performances motrices. Les enfants, dans la grande majorité des cas, font donc des progrès et le niveau moteur acquis entre 3 et 4 ans est donc le reflet de la capacité de myélinisation.

Quatre formes ont donc été définies en fonction du niveau acquis : aucune acquisition (forme 0), tenue de tête (forme 1), tenue assise (forme 2), tenue debout/marche avec aide (forme 3). La majorité des enfants acquièrent la tenue de tête, parfois la tenue assise et rarement la marche avec aide (Cailloux et al., 2000). Du fait de l'instabilité de l'influx nerveux, des crises de nature épileptiques sont quelque fois observées mais ne sont jamais au premier plan.

- Au-delà de 4-5 ans apparaissent les signes de souffrance axonale et de synaptogénèse liés au trouble de la myélinisation: une raideur de type spastique apparaît d'abord aux

membres inférieurs (paraplégie spastique), puis aux membres supérieurs (quadruplégie spastique), ainsi qu'une scoliose. La dégradation s'accroît lors de l'entrée dans l'adolescence. Elle se poursuit lentement avec le vieillissement de façon ascendante progressive responsable d'une atrophie du nerf optique, de troubles sphinctériens et d'une quadruplégie spastique particulièrement sévère. Le décès est le fait de complications de décubitus. La survie est donc corrélée au niveau neuromoteur acquis, la majorité des patients survivant au-delà de la 4^{ème} décennie. Certains patients décèdent cependant brutalement du fait de troubles neurovégétatifs (apnées, malaise vagal) d'origine encore mal comprise.

Les capacités cognitives sont corrélées au niveau neuromoteur avec dans tous les cas, un niveau d'échange et de compréhension meilleur que le niveau neuromoteur. Les enfants ayant acquis la position assise acquièrent, dans la grande majorité, une excellente compréhension avec un langage simple mais utilisable. Les enfants ayant acquis la marche avec aide sont souvent capables d'apprendre à lire avec aide, mais avec un niveau rarement supérieur aux apprentissages basiques du primaire. Il existe toujours une dissociation entre les capacités de langage et exécutives. Le maximum des capacités cognitives est, là aussi, acquis entre 5 et 10 ans. Une dégradation nette des fonctions exécutives avec un dysfonctionnement frontal (anxiété, idées fixes, désinhibition...) est observée au cours de l'adolescence, puis du vieillissement, rendant une autonomie de vie impossible même dans les formes 3 (O. Boespflug-tanguy, communication personnelle).

Dans tous les cas, l'IRM cérébrale montre un aspect hypomyélinisé diffus. La SB sous-tentorielle (cervelet, tronc cérébral) est toujours de meilleure qualité que la SB sus-tentorielle (hémisphères cérébraux). Une corrélation existe entre le niveau de la myélinisation et le niveau neuromoteur acquis. A l'entrée dans l'adolescence apparaît une atrophie cérébrale corticale et sous corticale progressive liée à l'axonopathie avec perte neuronale (Schiffmann et Boespflug-Tanguy, 2001; Sima et al., 2009).

Les potentiels évoqués montrent une désynchronisation sévère et précoce avec des ondes non enregistrables à l'entrée dans le cerveau à tous les modes (potentiels moteurs, somesthésiques et auditifs) (Nezu, 1995).

En 1985, la localisation du gène *PLP1* sur le chromosome X, a fait évoquer la possible implication de ce gène dans le phénotype PMD (Willard et Riordan, 1985). En 1987, Cremers a identifié une duplication du gène *PLP1* en rapport avec une large duplication d'un fragment chromosomique Xq21-q22 chez un patient PMD (Cremers et al., 1987). En 1989, les premières mutations ponctuelles faux-sens, responsables de PMD, ont été décrites par Hudson et al. et Gencic et al. (Gencic et al., 1989; Hudson et al., 1989), puis une délétion complète du

gène *PLP1* a été rapportée comme responsable d'un phénotype modéré de PMD (Raskind et al., 1991). Par la suite, une duplication de la totalité du gène *PLP1* a été mise en évidence dans la grande majorité des cas (80%) (Cailloux et al., 2000; Inoue, 2005). Ces duplications peuvent être de taille variable, sans corrélation entre la taille de la duplication et la sévérité phénotypique (Regis et al., 2008). Le mécanisme par lequel surviendraient les duplications du gène *PLP1* a été récemment clarifié et dénommé FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching). En effet, ces réarrangements complexes non récurrents ne peuvent pas être expliqués par des événements de recombinaison classique (recombinaison homologue, jonction des extrémités non homologues ou recombinaison homologue non allélique). Le nouveau mécanisme FoSTeS implique que, durant la réplication de l'ADN, le brin en cours d'élongation se désengage de sa matrice pour envahir une autre fourche de réplication. La synthèse d'ADN redémarre alors après hybridation au niveau d'une séquence présentant une micro-homologie entre le brin en cours de synthèse et la nouvelle matrice. Celle-ci n'est pas forcément adjacente à la fourche de réplication initiale, mais probablement physiquement proche dans la conformation ADN tridimensionnelle (sur le même chromosome voire sur un chromosome différent). L'élongation du brin envahissant va se poursuivre en copiant la matrice de la nouvelle fourche de réplication. Selon le sens de progression de cette fourche, la progression de la réplication du fragment incorporé de façon erronée se produira en orientation directe ou inversée. De plus, selon la position de la nouvelle fourche de réplication, il en résultera sur le chromosome, une délétion ou une duplication. Ce processus peut se répéter en série et explique les réarrangements complexes observés, possédant des régions de micro-homologie aux « points de cassures ». Des séquences répétitives de type LCRs (Low-copy repeats) dans les régions génomiques proches de *PLP1* seraient des zones préférentielles de micro-homologie (Lee et al., 2006, 2007).

Les mutations ponctuelles faux-sens seraient responsables des phénotypes de PMD les plus sévères (Cailloux et al., 2000; Inoue, 2005). Des triplications et des quintuplications du gène ont également été décrites, liées à un phénotype sévère (Wolf et al., 2005).

Des mutations ponctuelles dans des régions introniques de *PLP1* ont également été rapportées plus récemment, dont la traduction phénotypique peut être de sévérité variable (Cailloux et al., 2000; Hobson et al., 2002; Bonnet-Dupeyron et al., 2008). Aucune mutation affectant l'expression de l'isoforme DM20 seule n'a été rapportée, traduisant le caractère possiblement létal de l'absence de l'isoforme DM20 (Hobson et al., 2006).

b. La paraplégie spastique de type 2 (SPG2)

(Pour revue, Inoue, 2005)

Les SPG représentent un groupe hétérogène de pathologies caractérisées par une dégénérescence progressive et prédominante des voies cortico-spinales motrices (faisceau pyramidal). La SPG2 a été individualisée de l'ensemble des SPG du fait de son caractère lié à l'X (survenant chez les garçons), de son début précoce, le plus souvent dès l'âge de 2 ans et de son aggravation nette à l'adolescence associée à une survie normale (Johnston et McKusik, 1962). Différents éléments cliniques ont permis de suspecter un continuum entre la PMD de type 3 et la SPG2 rendant la frontière entre les deux affections parfois confuse : (1) de nombreux patients SPG2 ont un nystagmus initial, une dysarthrie, des troubles cognitifs de type dysexécutifs et visuo-spatiaux, (2) une anomalie diffuse plus modérée de type hypomyélinisante de la SB est observée à l'IRM, (3) les potentiels évoqués moteurs et somesthésiques montrent un ralentissement sévère des conductions centrales intracérébrales, (4) la présence d'individus SPG2 dans des familles atteintes de PMD de type 3. Une co-localisation du locus SPG2 en Xq22.2 contenant *PLP1*, puis la découverte de mutations de *PLP1* (mutations ponctuelles ou grandes délétions) chez les patients SPG2 (Saugier-Weber et al., 1994; Osaka et al., 1995) a finalement permis de classer cette affection dans les PLP-pathies. Ces formes sont davantage liées à l'absence d'expression des protéolipoprotéines (délétion génique ou mutation nulle) ou de l'isoforme PLP seule (anomalie d'épissage) (Garbern et al., 1997; Cailloux et al., 2000).

Actuellement, ne sont considérés comme SPG2 (ou PLP-pathie de type 4) que les patients ayant eu un développement moteur normal ou légèrement décalé pendant la première année de vie, avec une marche stable acquise avant l'âge de 18 mois, attestant d'une dynamique de myélinisation normale. Chez les garçons, survient progressivement, entre 2 et 10 ans, une faiblesse et une spasticité des membres inférieurs, associées à un aspect faiblement myélinisé de façon diffuse de la SB à l'IRM cérébrale, mais toujours plus important que ce qui est observé chez les patients PMD. Un nystagmus transitoire, une ataxie, une dysarthrie (troubles de l'articulation de la parole) sont souvent observés. Dans tous les cas, il existe une dégradation progressive s'accroissant à l'adolescence, puisque la grande majorité des patients sont obligés d'utiliser un fauteuil roulant à la sortie de l'adolescence. La progression de l'atrophie optique, de la paraplégie spastique et des troubles sphinctériens aboutissent à un handicap sévère lors de l'entrée dans la 3^{ème} décennie. Une neuropathie périphérique de type démyélinisante est souvent observée, liée semble-t-il à l'absence de PLP (Garbern et al., 1997, 1999; Shy et al., 2003).

Les apprentissages scolaires sont de meilleure qualité que dans la PMD, mais du fait des troubles dysexécutifs progressifs très peu de patients ont un apprentissage permettant un enseignement secondaire et une autonomie professionnelle. Dans ces formes les troubles du comportement avec anxiété, les troubles obsessionnels compulsifs, les idées délirantes et les accès de colère, sont souvent au premier plan, entre 10 et 30 ans.

Les examens neuropathologiques sur des cerveaux de patients montrent une perte de myéline diffuse et étendue avec une relative préservation des fibres U sous-corticales (Sima et al., 2009). L'analyse des cerveaux, au microscope électronique, a montré que tous les axones identifiables sont entourés d'une gaine de myéline d'épaisseur convenable. Cependant, certaines fibres soumises à une dégénérescence wallérienne sont présentes dans la SB sous-corticale et le tractus optique. Des gonflements axonaux sont également identifiés de façon occasionnelle. La densité des axones myélinisés paraît également diminuée dans une forte proportion de SB cérébrale, tandis que les prolongements astrocytaires s'étendent nettement. Ces observations suggèrent donc l'apparition d'une dégénérescence axonale. Au niveau des tractus spinaux, une perte axonale irrégulière est observée dans les pyramides médullaires. Cependant, en localisation plus distale, la dégénérescence axonale est prédominante dans les tractus cortico-spinaux, les voies motrices descendantes majeures, au niveau cervical où les anomalies sont confinées aux régions latérales communiquant avec les jambes. De plus, on retrouve une dégénérescence dans le faisceau gracilis de la partie cervicale de la ME, mais pas au niveau lombaire. Dans les régions dégénérant, une absence d'axones et de myéline a été confirmée. Ces données coïncident avec une dégénérescence longueur-dépendante, sans démyélinisation significative, de ces longs tractus axonaux moteurs et sensoriels (Garbern et al., 2002).

2. Les PLP-pathies des femmes hétérozygotes

Les PLP-pathies ont été longtemps considérées comme des pathologies de transmission récessive liée à l'X, seuls les garçons étant atteints. Il s'agit en fait plus probablement d'une forme dominante liée à l'X d'expressivité variable chez les femmes hétérozygotes. Les mécanismes moléculaires de cette expression variable de la maladie chez les femmes ne sont pas encore élucidés.

Plusieurs hypothèses peuvent entrer en jeu dans l'apparition de ces symptômes notamment des hypothèses portant sur (1) un biais du phénomène d'inactivation du chromosome X, (2) une modification de l'expression des gènes, liée à l'âge, (3) des voies alternatives pouvant intervenir au niveau du gène, des messagers ou des protéines, (4) ou encore l'intervention spécifique de facteurs modulateurs génétiques ou environnementaux.

On distingue d'une part des filles hétérozygotes présentant un tableau précoce proche de PMD et d'autre part des femmes hétérozygotes présentant un tableau tardif de type SPG2. Une symptomatologie de type PMD, en lien avec des mutations *PLP1*, a été décrite chez quelques filles, avec une amélioration pour certaines d'entre elles au cours du temps. Il semble que des conditions anténatales ou périnatales difficiles favorisent la symptomatologie précoce (Hodes et al., 1995; Inoue, 2005). D'autres patientes présentaient une duplication du gène *PLP1* en rapport avec un réarrangement chromosomique complexe induisant une duplication Xq22 (Ida et al., 2003; Yiu et al., 2009).

Même si à ce jour peu de travaux ont porté sur la symptomatologie des mères hétérozygotes transmettrices, des études ont montré une atteinte neurologique chez certaines d'entre elles (Hodes et al., 1995, 1997; Nance et al., 1996; Inoue et al., 2001; Marble et al., 2007; Yiu et al., 2009). Nance et al. ont étudié en 1996, le cas d'une mère de patient atteint d'une PMD de forme classique, qui a développé de façon tardive, à l'âge adulte, une démence associée à une anomalie sévère de la SB. Cependant, la question se posait de savoir si cette atteinte était due uniquement à la mutation *PLP1* qu'elle portait, à une atteinte secondaire exacerbée par cette mutation *PLP1* ou à une atteinte indépendante de cette mutation (Nance et al., 1996). D'autres équipes ont étudié des cas de mères transmettrices présentant des symptômes, notamment l'apparition de tremblements ou de dysfonctionnements moteur, d'atteintes cognitives, de neuropathies périphériques en fonction de la nature de la mutation du gène *PLP1* (Hodes et al., 1995, 1997).

Les analyses de plusieurs familles présentant des mutations du gène *PLP1* ont permis de mettre en évidence des différences phénotypiques entre les mères porteuses de mutations responsables de formes sévères chez leurs garçons, et celles porteuses de mutations à l'origine de formes plus modérées (Inoue et al., 2001). En effet, les mères présentant des duplications ou des mutations ponctuelles de *PLP1* responsables de formes sévères de PMD sont habituellement considérées comme asymptomatiques, tandis que certaines mères porteuses de mutations nulles ou ponctuelles responsables de formes modérées de PMD/SPG2 développent une paraplégie spastique tardive (au-delà de la 3^{ème} décennie) parfois associée à une démence frontale au-delà de 50 ans (Raskind et al., 1991; Hodes et al., 1995, 1997).

Le caractère dominant négatif des mutations *PLP1* vis-à-vis des OLs myélinisants dans les formes PMD pourrait expliquer la moins grande fréquence des symptômes chez les femmes transmettrices (**Figure 38**). En effet, suite au phénomène d'inactivation aléatoire du chromosome X, processus épigénétique consistant à mettre sous silence un des deux chromosomes X et permettant ainsi d'équilibrer entre les sexes le dosage des gènes liés à l'X,

les femmes hétérozygotes possèdent deux populations de précurseurs d'OLs : les cellules exprimant l'allèle *PLP1* normal et celles exprimant seulement l'allèle *PLP1* mutant.

Lorsque que les mutations *PLP1* ont un effet dominant négatif (duplications, mutations faux sens), les OLs activant l'allèle muté, ne se différencient pas et meurent par apoptose ; seuls les OLs activant l'allèle normal survivent. Les OLs étant en excès à la naissance et étant capables de se multiplier au moment de la naissance en cas de déficit, un phénomène de compensation permet d'aboutir à un taux d'OLs normal (**Figure 38a**).

Dans le cas de mutations de *PLP1* à l'origine de phénotypes modérés, les OLs porteurs de l'allèle muté survivent et mûrissent pendant le développement, de la même façon que les OLs porteurs de l'allèle normal, aboutissant à la formation d'une gaine de myéline provenant des deux populations d'OLs. La myéline « mutante » est cependant plus instable. Les axones étant myélinisés par plusieurs types d'OLs, certaines portions se démyélinisent expliquant les manifestations cliniques d'apparition tardive qui peuvent survenir chez ces mères transmettrices (**Figure 38b**). Ces hypothèses sont soutenues par des études menées sur des modèles animaux mutants *Plp1*, notamment la souris *jimpy*, modèle de forme sévère de PMD (Bartlett et Skoff, 1986, 1989), et la souris hétérozygote *rumpshaker*, modèle de SPG2 (Fanarraga et al., 1991).

L'hypothèse d'une inactivation préférentielle de l'X normal a été proposée chez les filles présentant une dysmyélinisation précoce proche de PMD. En effet, si l'inactivation de l'X est biaisée, et que le chromosome X normal est sélectivement ou préférentiellement inactivé, de nombreux précurseurs d'OLs vont exprimer l'allèle *PLP1* dupliqué et ne pas se différencier. Il en résulte un nombre limité de cellules précurseurs capables d'initier la formation de la myéline et une majorité d'axones non myélinisés. En conséquence, les femmes porteuses peuvent manifester un phénotype clinique hypomyélinisant proche de PMD. Cependant, ces axones peuvent être par la suite myélinisés par les OLs normaux entrant dans un processus compensatoire conduisant à une amélioration des symptômes cliniques (**Figure 38c**). Ce phénomène de biais d'inactivation du chromosome X peut être le résultat d'un événement aléatoire, d'un défaut du contrôle primaire de l'inactivation de l'X ou d'un effet secondaire dû à une sélection cellulaire après l'inactivation de l'X. Une sélection contre les cellules portant la mutation sur l'X actif pourrait être la base des différences entre les femmes porteuses de mutations ponctuelles et de duplications. Cette hypothèse est soutenue par une étude sur un modèle animal, le chien «*shaking*», qui contrairement aux mutants rongeurs, développe d'importants tremblements qui disparaissent avec le temps, suggérant la présence d'un mosaïsme étendu de la myéline du SNC (Duncan et al., 1987a; Cuddon et al., 1998).

Certains facteurs peuvent réduire le potentiel mitotique de cellules précurseur normales provoquant une suppression ou une diminution de la compensation de myéline (**Figure 38d**). Ces facteurs incluent des altérations de l'allèle normal de *PLP1* ou des mutations dans d'autres gènes de la voie de myélinisation du SNC qui réduisent le potentiel de prolifération et de compensation de la dysmyélinisation.

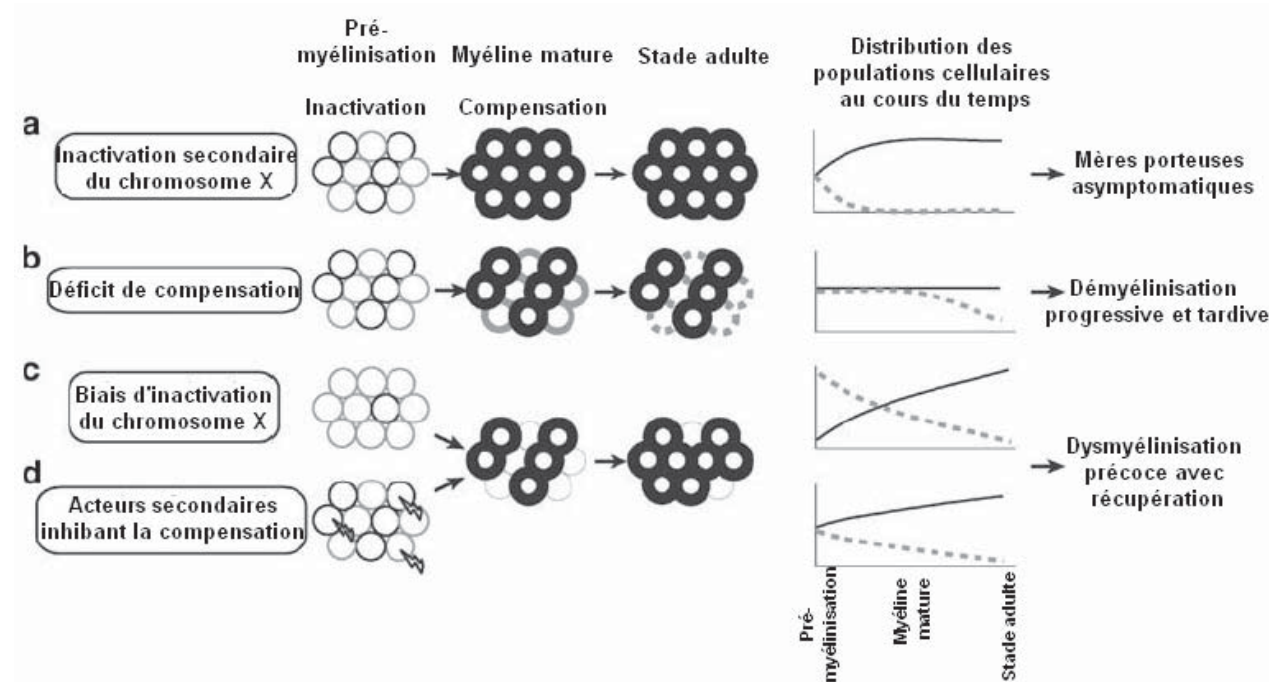


Figure 38. Représentation des populations d'oligodendrocytes en fonction du type de mutation porté chez les femmes hétérozygotes.

- Cas d'une mutation à l'origine d'un phénotype sévère. Lors de l'inactivation du chromosome X, les OLs portant l'allèle normal (cercles noirs fins) sont conservés tandis que ceux portant l'allèle muté (cercles gris clair) sont éliminés pendant le développement et la myéline se forme normalement (cercles noirs épais).
- Cas d'une mutation à l'origine d'un phénotype modéré. Les OLs portant l'allèle muté sont conservés et participent à la formation d'une myéline instable (cercles gris épais) qui se dégrade tardivement (cercles gris en pointillés).
- Cas d'un biais d'inactivation du chromosome X. La population d'OLs portant l'allèle muté est majoritaire au départ provoquant une dysmyélinisation précoce mais une récupération survient au stade adulte suite au phénomène de compensation.
- Cas de l'intervention d'acteurs secondaires inhibant la compensation. Une récupération survient également au stade adulte suite au phénomène de compensation. (D'après, Inoue, 2005).

3. Les modèles animaux

La recherche sur la physiopathologie et les thérapies potentielles des PLP-pathies a été grandement aidée par la disponibilité de plusieurs modèles animaux mutants de la myéline, naturels ou transgéniques. Comme pour la PMD et la SPG2, ces mutants ont des phénotypes variables des formes les plus sévères avec un décès très précoce, aux formes les plus modérées sans atteinte de la durée de vie. L'élaboration de modèles rongeurs transgéniques sur-exprimant ou sous-exprimant *Plp1* a offert un outil idéal à la recherche des effets d'anomalies de PLP sur la formation de la myéline et son maintien.

a. Les mutants naturels

(Pour revue, Duncan et al., 2011)

Des mutations du gène *Plp1* ont été retrouvées chez plusieurs espèces animales, notamment les souris « jimpy », le rat « md » déficient en myéline, le chien « sh » tremblant, le lapin « pt » aux tremblements paralytiques ou encore le cochon.

(1) Les souris mutants naturels

Il a été identifié quatre type de modèles souris présentant une mutation spontanée du gène *Plp1* :

- Une première souris de fond génétique C57BL/6J dénommée « *jimpy* » et présentant une mutation spontanée avec un phénotype d'hypomyélinisation de transmission liée à l'X a été décrite en 1964 (Sidman et al., 1964). Les mâles hémizygotes *jimpy* développent un phénotype sévère, marqué par l'apparition, dès 10 à 12 jours après la naissance, d'une atteinte motrice avec tremblements puis convulsions. Ces animaux ont une perte de poids, une diminution des vocalisations ultrasonores et une activité réduite comparé aux animaux normaux. La mort survient habituellement à l'âge d'environ 1 mois suite à une paralysie respiratoire. L'examen neuropathologique de ces souris, révèle une très faible quantité de myéline dans le SNC suite à la mort des OLs matures (Knapp et al., 1986; Vermeesch et al., 1990; Thomson et al., 1999). Des équipes ont mis en évidence une anomalie génétique dans le gène murin *Plp1*, notamment une mutation ponctuelle sur le site accepteur d'épissage de l'exon 5, induisant une perte de 74 paires de bases dans la séquence de l'ARNm et un décalage du cadre de lecture. Il en résulte une anomalie de la séquence C terminale des protéines PLP/DM20 formées (Hudson et al., 1987; Nave et al., 1987) (**Figure 39**). Chez ces animaux la faible quantité de myéline formée présente une anomalie de compaction, et particulièrement des défauts au niveau des IPLs, empêchant les protéines PLP/DM20 de s'intégrer à la membrane cytoplasmique (Duncan et al., 1989).

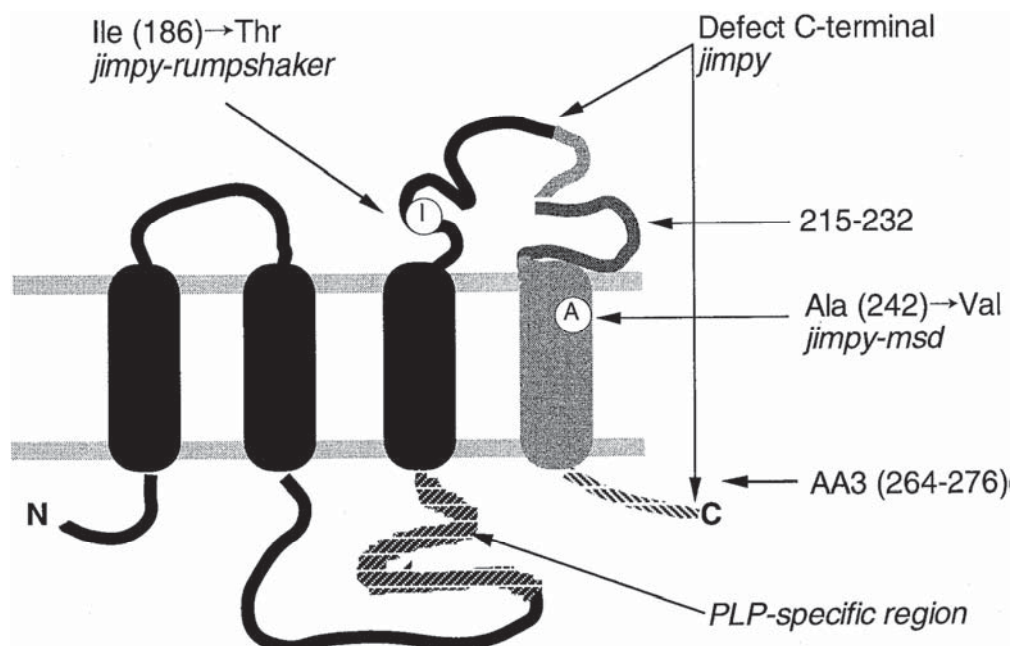


Figure 39. Positions sur PLP des mutations présentes chez les différents souris mutants naturels.

Dans le mutant *jimpy*, on trouve une conversion A>G dans le 4^{ème} intron de *Plp*. 2 positions indépendantes de substitution d'un acide aminé induisent une hypomyélinisation (mutants *jimpy-msd* et *jimpy-rumpshaker*).

(D'après, Yamada et al., 2001)

▪ Un second mutant spontané, appelé « *jimpy-msd* » (msd pour « myelin synthesis-deficient »), de même fond génétique, présentant un phénotype de transmission liée à l'X proche de celui de la souris *jimpy*, a été décrit en 1973 (Eicher et Hoppe, 1973). Cet animal est porteur d'une autre mutation ponctuelle dans l'exon 6 du gène *Plp1*, induisant un changement d'acide aminé dans le quatrième domaine transmembranaire des protéines PLP/DM20 (Gencic et Hudson, 1990) (**Figure 39**).

▪ En 1990, la souris mutante « *jimpy-rumpshaker* », issue d'un fond génétique C3H, a été décrite (Griffiths et al., 1990) et caractérisée par un phénotype plus modéré que les deux autres mutants, marqué par des tremblements transitoires, sans convulsions et une survie normale. Cette souris possède une myéline en quantité normale et le nombre d'OLs dans la SB est conservé (Griffiths et al., 1990; Fanarraga et al., 1992; McLaughlin et al., 2006, 2007). L'analyse génétique révèle une mutation ponctuelle dans l'exon 4 du gène *Plp1*, donnant un changement d'acide aminé dans la deuxième boucle extracellulaire des protéines PLP/DM20.

La même mutation a été retrouvée chez l'Homme, associée à un phénotype modéré de SPG (Svenstrup et al., 2010). L'étude des conséquences de la mutation *jimpy-rumpshaker* dans le fond génétique C57BL/6J s'est révélé avoir un phénotype beaucoup plus sévère que celui du fond génétique C3H, associé à une altération plus importante de la myéline et du nombre d'OLs, sans différence de trafic intracellulaire de PLP/DM20 mais avec une différence d'induction de la voie UPR (pour « unfolded protein response ») (**Figure 40**) selon le fond génétique qui expliquerait les degrés différents d'apoptose des OLs matures (McLaughlin et al., 2007). Ceci suggère l'existence de susceptibilité génétique différente pouvant expliquer une variation du phénotype par une mutation identique.

- Un dernier mutant spontané appelé « *jimpy 4J* » a été décrit chez la souris comme présentant un phénotype proche voire légèrement plus sévère que celui de la souris *jimpy*. Ce mutant est porteur d'une mutation ponctuelle dans l'exon 2 du gène *Plp1* induisant un changement d'acide aminé dans la première boucle extracellulaire de la protéine (Billings-Gagliardi et al., 1995; Pearsall et al., 1997).

In vivo, l'absence de restauration phénotypique chez les animaux *jimpy* lors de l'expression induite des protéines sauvages a suggéré un effet gain de fonction toxique dominant des protéines mutantes (Nadon et al., 1994). Cependant, aux stades immatures, les OLs *jimpy* sont sensibles à la restauration d'un environnement sauvage, favorisant leur prolifération (Bartlett et al., 1988; Lachapelle et al., 1991). La prolifération et la maturation des OLs ne semblent pas bloquées chez ces mutants alors que la survie des OLs matures est altérée (Gow et al., 1998). Il existe plusieurs hypothèses qui ne sont pas forcément exclusives :

(1) L'étude comparative *in vitro*, de l'effet de ces différentes mutations sur le trafic intracellulaire de PLP/DM20, dans des lignées fibroblastiques puis dans les lignées d'OLs immortalisés, a mis en évidence une absence d'intégration membranaire des protéines mutées due à un défaut d'adressage à la membrane plasmique et à une accumulation de ces protéines dans le RER (Thomson et al., 1997; Ghandour et al., 2002). Cette accumulation a été suggérée comme toxique pour la cellule et responsable de la mort par apoptose des OLs matures (Gow et al., 1998).

(2) De plus, les protéines mutées formeraient de façon anormalement précoce des oligomères dans le RER, sans formation associée d'agrégats protéiques ni perturbation du trafic protéique intracellulaire (Swanton et al., 2005). Secondairement, une activation anormale de la voie UPR, a été mise en évidence *in vitro* dans des cellules fibroblastiques transfectées avec des ADNc *Plp* mutants. La voie UPR est un mécanisme de défense cellulaire présent chez les eucaryotes, qui consiste à maintenir un équilibre cellulaire entre la synthèse, l'utilisation et la dégradation protéique. En cas d'accumulation anormale de protéines dans le RER, des

protéines « capteur » du stress cellulaire activent une cascade cellulaire induisant une diminution de synthèse protéique et une accentuation de l'utilisation et de la dégradation protéique à partir du RER, afin de réduire l'accumulation protéique dans le RER et de rétablir l'homéostasie cellulaire (Southwood et al., 2002; Roboti et al., 2009) (**Figure 40**).

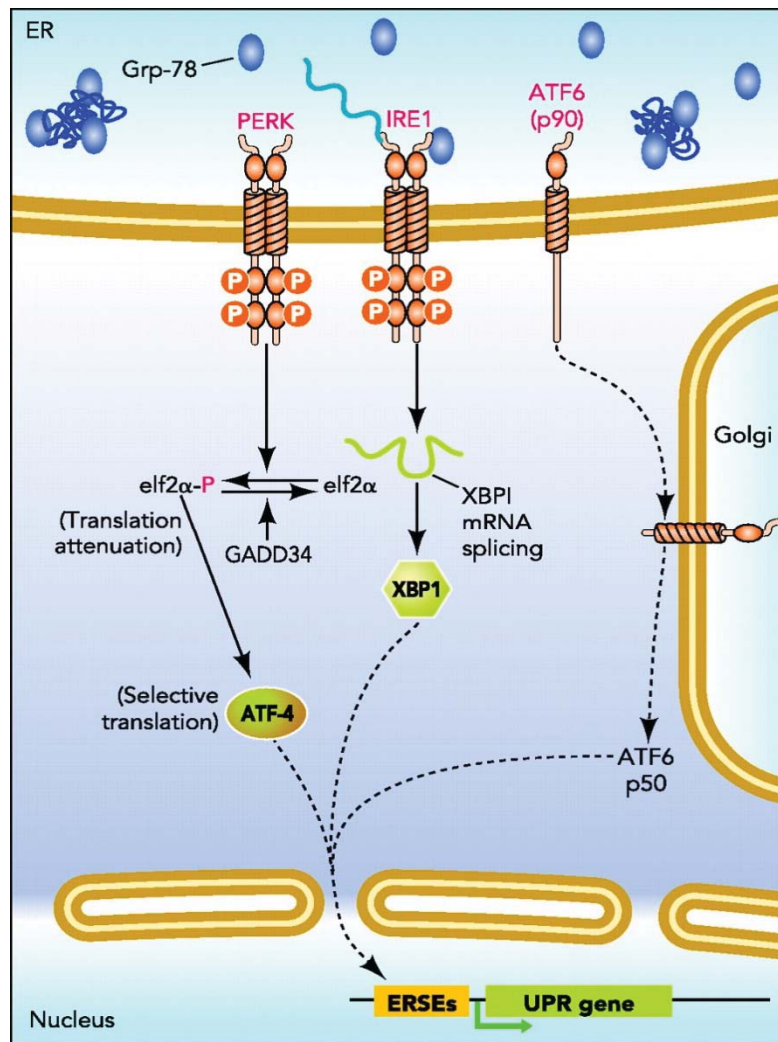


Figure 40. Schématisation de la voie de réponse aux protéines mal repliées (voie UPR).

L'UPR passe par l'intermédiaire de trois protéines transmembranaires qui détectent le stress du réticulum endoplasmique (RE) et déclenchent des voies en aval. La kinase PERK est activée par dimérisation et phosphorylation, puis phosphoryle à son tour eIF2α. Ce dernier augmente la traduction du facteur de transcription ATF4 qui induit l'expression de gènes cibles UPR. L'activation de IRE1 par dimérisation et phosphorylation induit l'épissage de l'ARNm de XBP1, dont la traduction produit un facteur de transcription qui régule les gènes cibles via le promoteur ERSE. L'activation de ATF6 implique une protéolyse intramembranaire régulée. La protéine migre depuis le RE vers le Golgi où elle est traitée protéolytiquement pour libérer un facteur de transcription de 50 kDa qui migre vers le noyau et lie les ERSEs des gènes cibles UPR. Les trois protéines transmembranaires sont censées détecter le stress du RE à travers la liaison/libération de Grp78 via leurs respectifs domaines liminaux, bien que les études structurales aient également suggérées que IRE1 pouvait interagir directement avec les protéines mal repliées. La protéine GADD34, une protéine phosphatase régulée par la voie PERK, déphosphoryle eIF2α pour restaurer la synthèse des protéines. (D'après, Lai et al., 2007).

(3) De plus, une dégradation accélérée des protéines mutantes par le processus ERAD (pour « ER-associated degradation ») a été récemment identifiée. Ce processus permet la translocation des protéines accumulées dans le RER vers le cytosol puis leur élimination par la voie ubiquitine-protéasome (**Figure 41**).

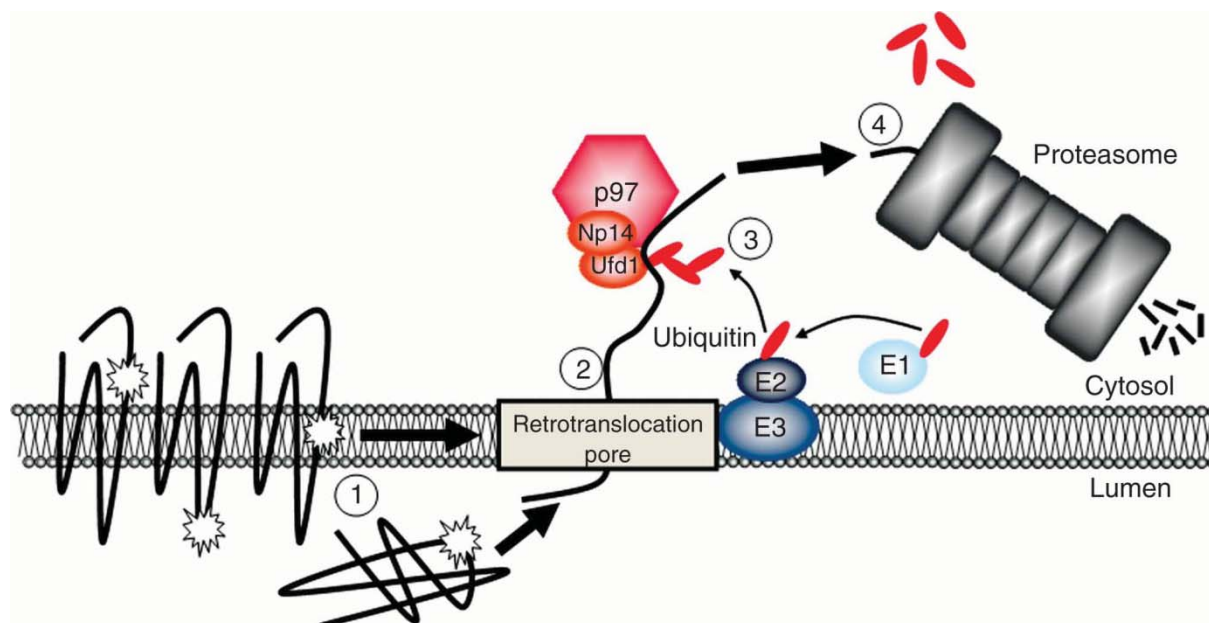


Figure 41. Schématisation de la voie de dégradation associée au réticulum endoplasmique (Voie ERAD).

La membrane de ERAD ou les protéines luminales contenant des aberrations (étoiles), que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur de la bicouche membranaire, peuvent être traitées par un processus comprenant 4 étapes consistant en ① une reconnaissance de la protéine mutée ou mal repliée, ② une rétrotranslocation dans le cytosol, ③ une ubiquitination grâce au complexe de facteurs liant l'ubiquitine p97-Np14-Ufd1 et l'intervention d'une cascade de réactions enzymatiques (E1,E2,E3), ④ une dégradation par le protéasome.

(D'après, Wojcikiewicz, 2012)

Ces résultats récents suggèrent que l'apoptose des OLs matures en cas de mutation faux-sens pourrait être secondaire à un dépassement de la voie ERAD puis à une activation excessive de la voie UPR (Krämer-Albers et al., 2006; Roboti et al., 2009). Récemment, l'étude *in vitro* dans des lignées fibroblastiques de mutations ponctuelles induisant des phénotypes de sévérité variable chez la souris et chez l'homme, a montré que le degré de rétention protéique dans le RER ne suffisait pas à expliquer la sévérité phénotypique, mais que certaines mutations sévères induiraient une augmentation de l'oligomérisation protéique (sans induire d'agrégation protéique), conduisant à une résistance au processus ERAD et à une activation forte de la voie UPR, contrairement à des mutations aux conséquences plus modérées (Roboti et al., 2009).

(4) De plus, une capacité de régulation du taux des protéolipoprotéines qui passerait par un peptide présent dans la séquence PLP-spécifique de l'isoforme PLP, serait perdue par les protéines mutantes (Southwood et al., 2007).

(5) Par ailleurs, une diminution d'interactions entre les protéines mutantes et le cholestérol intracellulaire a été démontrée dans les OLs *in vitro*, entraînant un défaut d'adressage membranaire des protéines mutantes par défaut d'intégration dans les radeaux lipidiques alors que le trafic intracellulaire des lipides n'est pas altéré.

(2) Les rats mutants naturels

Depuis 1979, un mutant spontané chez le rat, appelé rat « *md* » (pour « myelin deficient »), a été décrit comme présentant les mêmes caractéristiques phénotypiques et neuropathologiques que la souris *jimpy* (Csiza et de Lahunta, 1979; Duncan et al., 1987b). Ces animaux sont porteurs d'une mutation ponctuelle dans l'exon 3 du gène *Plp1*, responsable d'un changement d'acide aminé en position 76 dans le deuxième domaine transmembranaire de la protéine PLP (Boison et Stoffel, 1989). Ce modèle a permis de mieux appréhender le rôle des protéolipoprotéines, notamment: (1) l'effet de l'acétylation des protéolipoprotéines sur la compaction des IPL (Bizzozero et al., 2001), (2) l'implication des protéolipoprotéines dans le fonctionnement des noyaux neuronaux du tronc cérébral, suggérée suite à la mort précoce par hypoxie-hypoventilation de ces mutants (Miller et al., 2003; Mayer et al., 2009), (3) le rôle de *Plp1* dans la répartition des protéines le long de l'axone suggéré par une répartition anormale des canaux sodiques au niveau des nœuds de Ranvier chez ces mutants (Kaplan et al., 1997), (4) un défaut de migration des OPCs au cours du développement suite à l'altération d'un complexe α_v -intégrine-calrétinine-protéolipoprotéines formé dans les OLs suite à la mutation *md* (Gudz et al., 2002, 2006).

De plus, ce modèle a servi lors d'études par tenseur de diffusion à montrer des modifications d'anisotropie correspondant à des anomalies de répartition des molécules d'eau dans la SB du SNC en l'absence de myéline (Gulani et al., 2001; Biton et al., 2006, 2007).

Enfin, ces animaux ont été utilisés pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les PLP-pathies, comme la transplantation fœtale de progéniteurs gliaux en intracérébral ou en intramédullaire, qui a montré une capacité de migration des progéniteurs des OLs vers la SB et de production de myéline (Learish et al., 1999; Bulte et al., 1999).

(3) Les mutants naturels d'autres espèces

Des espèces autres que le rat et la souris ont également été décrites présentant des mutations spontanées du gène *Plp* :

- En 1981, Griffiths et al. ont décrit tout d'abord le chien « *shaking pup* » qui manifeste un phénotype sévère lié à l'X, débutant dès le dixième jour de vie par des tremblements importants, suivis de convulsions et finalement le décès survient au troisième ou quatrième mois de vie (Griffiths et al., 1981). Il a été mis en évidence chez cet animal, une mutation ponctuelle dans l'exon 2 du gène *Plp1* canin entraînant un changement d'acide aminé en position 37 dans la première boucle extracellulaire de la protéine PLP (Nadon et al., 1990). Les analyses neuropathologiques et histologiques chez ce mutant ont montré une hypomyélinisation importante. La faible quantité de myéline présente est décompactée. Quelques fibres myéliniques restent marquées positivement pour PLP, mais la majorité des protéines mutées ne transitent pas à la membrane et sont visibles dans le RER. De plus, une diminution du nombre d'OLs matures sans défaut de maturation de la lignée oligodendrocytaire a été décrite (Song et al., 2006).

- Un autre mutant décrit est le lapin « *paralytic tremor* » qui manifeste un phénotype plus modéré avec des tremblements et des parésies des membres (Osetowska, 1967). Ce lapin est porteur d'une mutation ponctuelle dans l'exon 2 entraînant un changement d'acide aminé en position 37 dans la première boucle extracellulaire de la protéine (Tosic et al., 1994). Contrairement aux autres mutants *Plp1*, ce lapin présente un phénotype relativement modéré avec une hypomyélinisation modérée sans mort des OLs matures (Taraszewska et Zelman, 1987). De plus, le mutant *paralytic tremor* a été comparé au mutant *shaking*, car ces animaux présentent une mutation qui affecte le même acide aminé dans la protéine, mais qui n'entraîne pas le même changement d'acide aminé, ni le même phénotype. Les études in vitro de l'effet de chacune de ces mutations ont montré que la mutation *shaking* entraînait une plus grande rétention des protéolipoprotéines mutées dans le RER que la mutation *paralytic tremor*. La différence phénotypique de ces mutants pourrait donc être liée à une différence de trafic intracellulaire des protéines mutées (Tosic et al., 1997).

b. Les modèles murins transgéniques

(1) Les souris et les rats sur-exprimant *Plp1* (ou *PLOA*)

En 1994, deux modèles souris sur-exprimant le gène *Plp1* ont été développés, ils ont permis par la suite de modéliser les formes les plus sévères de leucodystrophies dysmyélinisantes comme la PMD :

▪ Le premier modèle est issu de micro-injections dans des œufs murins au stade une cellule, d'un cosmide de 26,6 kb contenant le gène *Plp1* murin avec ses extrémités 5' et 3' transcrites mais non traduites (**Figure 42**). Deux lignées transgéniques, #66 et #72, ont pu être obtenues à partir de ces micro-injections. Elles contiennent respectivement, à l'état hétérozygote, sept et trois copies du gène *Plp1* (Readhead et al., 1994). Les animaux hétérozygotes de la lignée #72 n'ont pas de phénotype évident, alors que les animaux hétérozygotes de la lignée #66, avec un plus grand nombre de copies de *Plp1*, développent des signes moteurs après quatre mois, en rapport avec une démyélinisation d'intensité variable et une dégénérescence axonale. Les études histopathologiques chez les animaux hétérozygotes des deux lignées montrent un RER et un appareil de Golgi vacuolisés et surchargés. Malgré l'apparente perturbation du trafic intracellulaire des protéolipoprotéines, les OLs gardent une capacité de myélinisation et un marquage membranaire PLP/DM20 (Anderson et al., 1998). De plus, les protéolipoprotéines en excès sont dégradées par la voie classique des endosomes tardifs/lysosomes et aucune activation de l'UPR n'a été observée (Southwood et al., 2002; Krämer-Albers et al., 2006). Bien que les IPL et MDL de ces animaux paraissent normales, traduisant une compaction correcte de la myéline, des anomalies de la membrane ont été rapportées, correspondant à un défaut d'interactions axone-OLs (Anderson et al., 1998).

Les animaux homozygotes de la lignée #66, présentant donc 14 copies de *Plp1*, développent un phénotype sévère proche de celui des souris *jimpy*, associé à une hypomyélinisation sévère et une mort des OLs, induisant des troubles moteurs dès 15 jours de vie et un décès précoce avant l'âge de trois mois. Ces souris affichent également une activation apoptotique de la voie indépendante des caspases, une augmentation du nombre de mitochondries dans les axones, une déplétion en ATP et une réduction du potentiel de membrane mitochondrial dans les neurones, les astrocytes et les OLs, contrairement aux animaux *jimpy* (Hüttemann et al., 2009; Hogan et al., 2009). Ceci semble refléter une adaptation énergétique des cellules du SNC en cas de surexpression de *Plp1* et impliquer un processus différent de mort des OLs par apoptose par rapport à celui induit par les mutations faux-sens. De plus, la protéine PLP serait capable, à l'aide de motifs spécifiques contenus dans ses régions N- et C-terminales, d'intégrer les membranes mitochondriales externes et internes, contrairement aux autres protéines de la myéline et d'interagir avec l'activité mitochondriale cytochrome c oxydase chez ces animaux transgéniques (Hüttemann et al., 2009). Les souris homozygotes de la lignée #72, présentant 6 copies de *Plp1*, développent, quant à elles, des convulsions après trois mois, induisant le décès après quatre à six mois de vie. Ces animaux manifestent une dysmyélinisation et une astroglie, mais le nombre d'OLs est cependant conservé.

Les résultats observés chez ces différentes lignées ont permis de confirmer « un effet dose-dépendant » de l'expression de *Plp1* (Readhead et al., 1994; Anderson et al., 1999; Karim et al., 2007, 2010). Enfin, le modèle de la lignée #72, ainsi que le modèle *jimpy-rumpshaker*, ont récemment été utilisés pour étudier l'implication respective de l'inflammation ou de la démyélinisation dans la dégénérescence axonale. Les résultats montrent une atteinte axonale importante à proximité des zones inflammatoires ou des OLs mutants alors que les axones entièrement démyélinisés sont plutôt préservés, suggérant que la démyélinisation n'est pas directement impliquée dans le processus de dégénérescence axonale (Edgar et al., 2010).

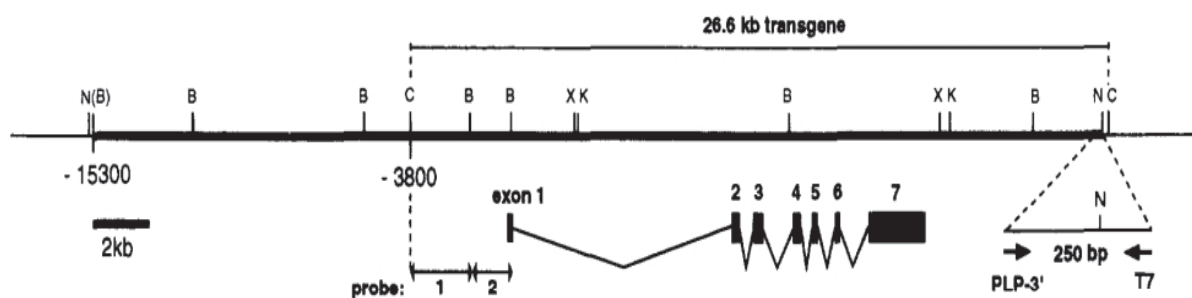


Figure 42. Développement d'un modèle souris surexprimant le gène *Plp1* (modèles PLOA #66 et #72).

Un fragment *Clal* de 26,6 kb contenant le gène *Plp1*, issu du cosmide COS901, qui contient l'unité complète de transcription des sept exons et 3,5 kb de la région régulatrice 5' de *Plp1*, a été purifié et utilisé pour produire la souris transgénique par une microinjection dans des œufs BDF2 fertilisés. Deux lignées ayant intégré des copies complètes du transgène en tandem, sur un autosome, ont été obtenues : la lignée #66 avec 7 copies et la lignée #72 avec 3 copies. (D'après, Readhead et al., 1994).

▪ Un second modèle souris sur-exprimant le gène *Plp1* a été également développé, par une équipe japonaise, par micro-injections dans des œufs murins au stade une cellule, d'un cosmide de 40 kb contenant le gène *Plp1* murin avec ses extrémités 5' et 3' transcrites mais non traduites. Une seule lignée a pu être obtenue appelée « lignée 4e », ayant intégré deux copies du gène *Plp1* murin à l'état hétérozygote au niveau autosomique. Les souris hétérozygotes ont un phénotype tardif marqué par des anomalies comportementales, altérations des interactions sociales, tremblements et ataxie discrets, associée à une myélinisation conservée, suivie d'une démyélinisation discrète tardive, d'une dégénérescence axonale et d'anomalies structurales secondaires des paranodes (Kagawa et al., 1994a; Inoue et al., 1996; Tanaka et al., 2009). Malgré l'intégration d'un plus faible nombre de copies que les autres lignées sur-exprimant *Plp1*, les homozygotes, possédant alors 4 copies du gène *Plp1* murin, ont un phénotype sévère associé à une ataxie, des tremblements, puis des convulsions conduisant au décès après un mois de vie. Une hypomyélinisation associée à une astroglie

est visible chez ces animaux. Une diminution du nombre d'OLs est observée, probablement en rapport avec un blocage de maturation des OLs. Des distensions du RER et de l'appareil de Golgi sont également observées dans les OLs de ces animaux (Kagawa et al., 1994a; Inoue et al., 1996). De plus, le croisement de cette lignée sur-exprimant *Plp1* sauvage avec la lignée *jimpy*, n'a pas permis de restaurer le phénotype des animaux *jimpy*, confirmant l'effet dominant de la mutation *jimpy* (Kagawa et al., 1994a).

La différence de phénotype entre les deux modèles surexprimant *Plp1* est probablement liée à la différence de site d'insertion des transgènes conduisant à une expressivité plus importante dans la lignée 4e.

- L'étude d'un autre modèle de souris sur-exprimant cette fois uniquement l'isoforme DM20 du gène *Plp1* murin, a permis d'observer un phénotype malade seulement après l'introduction de 70 copies du gène. Les troubles se manifestent par une ataxie et des convulsions à partir de trois mois, suivies d'un décès après huit à dix mois de vie. La myélinisation apparaît tout d'abord normale chez ces animaux mais est suivie d'une démyélinisation visible vers sept mois. Ces résultats semblent montrer que ce serait davantage la surexpression de l'isoforme PLP ou bien des deux isoformes associées qui conduirait au phénotype dysmyélinisant sévère (Johnson et al., 1995).

- Enfin, il existe également un modèle rat, sur-exprimant le gène *Plp1* murin, obtenu également par microinjections d'œufs au stade une cellule et modélisant la forme sévère congénitale de PMD (Bradl et al., 1999). Les rats hétérozygotes produisent un niveau normal de PLP et ne présentent pas les symptômes et la mort précoce caractéristiques de la forme congénitale de PMD, cependant on observe quand même une accumulation de PLP chez les animaux âgés, particulièrement dans la SG. Les animaux homozygotes, quant à eux, développent un tremblement précoce puis des convulsions conduisant au décès vers l'âge de trois semaines. Ils présentent une hypomyélinisation couplée à une perte du nombre d'OLs, particulièrement ceux présents dans la SG. Les OLs persistants ont, comme dans le modèle souris, une accumulation de protéolipoprotéines dans le RER (Bradl et al., 1999; Bauer et al., 2002). Très récemment, de nouvelles études sur ce rat sur-exprimant *Plp1* ont permis de déterminer le nombre exact de copies du gène jusqu'alors inconnu, et les effets exacts résultant de l'expression des transcrits et de la protéine. Il apparaît donc que ces animaux présentent 12 copies du gène *Plp1* à l'état homozygote. Une approche quantitative a démontré que les OLs des animaux homozygotes expriment des niveaux d'ARNm de *Plp1* environ 5 fois supérieurs à une semaine de vie, allant même jusqu'à 6 fois plus à la fin de leur vie, vers 3 semaines. Les niveaux d'expression protéique ont suggéré que la surexpression de l'ARNm de *Plp1* est si excessive chez les homozygotes qu'elle surcharge l'appareil traductionnel. Il en

résulte une incapacité de produire une protéine PLP intacte et fonctionnelle. Ces données corroborent la présence d'agrégats de PLP dans le cytoplasme et dans les prolongements oligodendrocytaires de ces animaux (Mayer et al., 2011).

Comme pour les souris présentant une inactivation du gène *Plp1*, il existe très peu d'informations concernant l'impact des altérations de la SB, d'un point de vue comportemental, sur les animaux sur-exprimant le gène *Plp*, excepté pour les souris de la lignée 4e (Kagawa et al., 1994a; Inoue et al., 1996; Tanaka et al., 2009).

(2) Les souris avec inactivation du gène *Plp1* (ou *Plp* null)

Un premier modèle de souris, présentant une inactivation du gène *Plp1*, a été développé par Boison et Stoffel en 1994. Ce modèle a été créé comme une invalidation isoforme-spécifique PLP ou DM20, par introduction d'une cassette néo en anti-sens, associée à une séquence exon 3a/3b ou seulement 3a, dans l'exon et l'intron 3 de *Plp1*. Cependant, l'ADNc de ce mutant présente un défaut d'épissage de l'intron 3, induisant une anomalie du cadre de lecture et une protéine PLP/DM20 tronquée. Ces animaux présentent un défaut de compaction de la myéline, mais les résultats obtenus sont difficilement interprétables du fait d'un réarrangement complexe associant une réduction d'expression génique, une anomalie d'épissage de l'ARNm de PLP/DM20 et une erreur de séquence protéique C-terminale (Boison et Stoffel, 1994).

En 1997, un nouveau modèle murin invalidé pour le gène *Plp1*, de fond génétique C57BL/6N, a été créé afin de modéliser les formes modérées de SPG2. Dans ce modèle, on a intégré par recombinaison homologue une cassette néo en anti-sens dans la partie 3' de l'exon 1 et dans l'intron 1 du gène *Plp1*, altérant ainsi le site d'initiation de la traduction du gène et remplaçant 2,5 kb de l'intron 1 (**Figure 43**). Dans ce modèle, l'expression des ARNm de PLP/DM20 persiste en faible quantité sous la forme d'un ARNm de 3,4 kb (correspondant à une taille aberrante de transcrit) dont la transcription est initiée dans la cassette néo et qui ne possède pas de site d'initiation de la traduction en phase avec les exons restants de *Plp1*. Au niveau protéique l'expression de PLP est donc complètement abolie (Klugmann et al., 1997). A l'origine, le phénotype de ces souris apparaît normal, mais les premières analyses comportementales ont mis en évidence une altération des performances motrices, d'apparition très tardive, après 16 mois de vie. Cette dégradation est couplée à une dégénérescence axonale tardive affectant le flux axonal rétrograde, sans atteinte majeure de la myélinisation (Griffiths et al., 1998b; Edgar et al., 2004). L'analyse ultra-structurale de la myéline chez ce modèle a montré une décompaction discrète de la myéline se traduisant par une formation anormale des

IPL couplée à une formation anormale du composant radial prenant un aspect « diagonal » et à une augmentation d'osmolarité dans la myéline (Rosenbluth et al., 2006, 2009).

Par ailleurs, une étude protéomique récente a révélé que la seule protéine semblant sous-exprimée chez le modèle invalidé PLP, était SIRT2, une déacétylase NAD⁺ dépendante transmembranaire, exprimée dans la myéline, qui pourrait intervenir dans la régulation de l'acétylation des protéines microtubulaires. PLP/DM20 auraient donc une action indirecte sur cette protéine (Werner et al., 2007). Enfin, de récentes analyses par tenseur de diffusion ont montré *in vivo* chez les animaux Plp null, des anomalies d'anisotropie de la SB et du compartiment axonal, s'accroissant avec l'âge, traduisant une atteinte de la myéline couplée à une atteinte axonale, ce qui conforte l'idée d'un trouble des interactions axone-OLs en l'absence de PLP/DM20 (Hassen et al., 2009). D'un point de vue comportemental, hormis quelques évaluations motrices au rotarod, il existe très peu d'informations concernant l'impact des altérations de la SB chez ces animaux, que ce soit pour les mâles hémizygotes ou les femelles hétérozygotes.

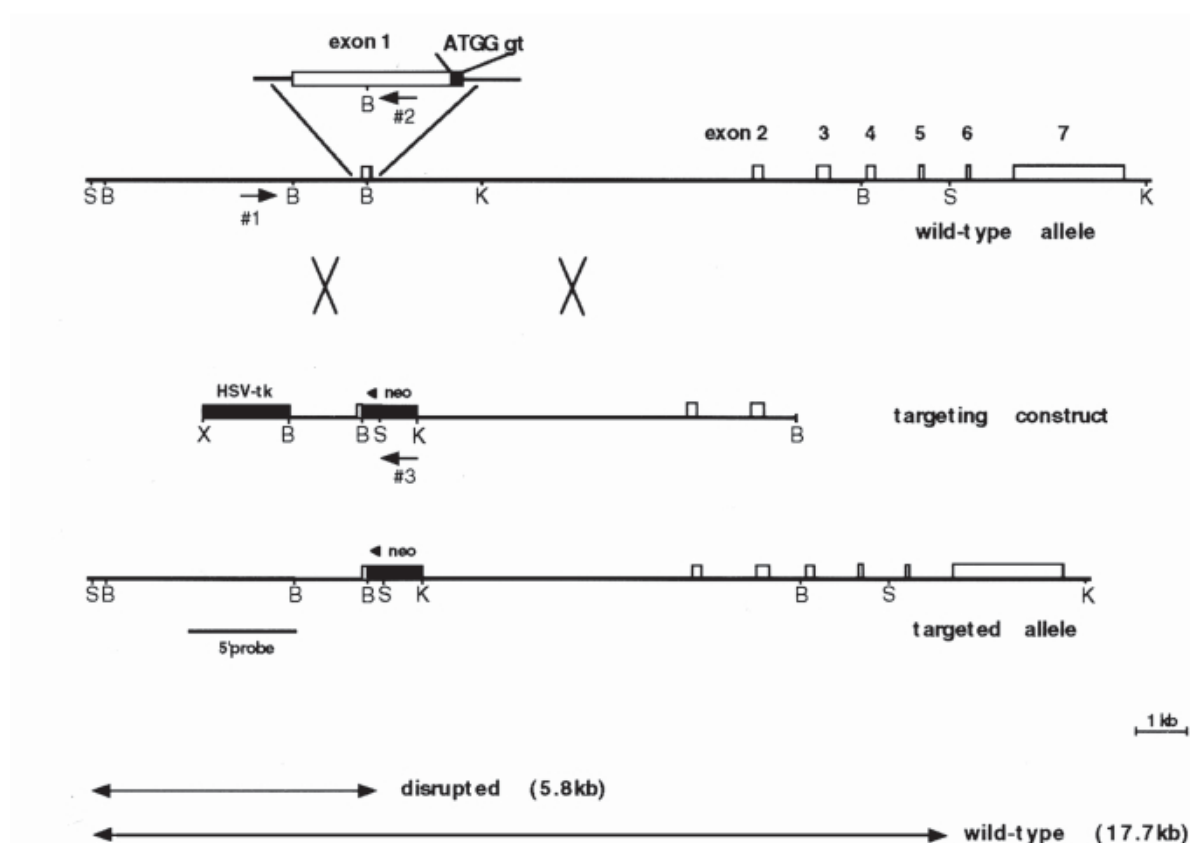


Figure 43. Développement d'un modèle de souris invalidée pour le gène *Plp1* (souris Plp null).

La structure du gène *Plp1* sauvage est représentée en haut par ses 7 exons, avec un agrandissement de l'exon 1 montrant le site d'initiation de la traduction. Après recombinaison homologe à l'aide d'un vecteur contenant une construction du gène avec une cassette néomycine (neo) anti-sens, l'extrémité 3' de l'exon 1 contenant le codon d'initiation de la traduction et 2,5 kb de l'intron 1, sont délévés. (D'après, Klugmann et al., 1997).

(3) Les souris exprimant DM20 seul

Il existe deux modèles souris n'exprimant que l'isoforme DM20.

Le premier a été obtenu par une double recombinaison homologue dans des cellules embryonnaires murines au stade blastocyste. Une cassette néo a été introduite dans l'intron 3 du gène *Plp1* associée à une mutation dans le site donneur d'épissage de l'exon 3b, de façon à ne plus exprimer ni PLP ni DM20. Une seconde recombinaison a permis d'exclure la cassette néo de l'intron 3, ne laissant que la mutation ponctuelle du site donneur d'épissage de l'exon 3b et bloquant l'expression de l'isoforme PLP. Les animaux invalidés pour les deux isoformes et ceux n'exprimant que DM20 présentent un même phénotype moteur tardif à 12 mois, associé à une décompaction discrète de la myéline et une dégénérescence axonale dès l'âge de 6 mois. On peut noter dans le SNC de ces animaux n'exprimant que DM20, une atteinte de la couche des cellules neuronales de Purkinje. Ces résultats suggèrent que l'isoforme DM20 chez la souris, comme chez l'Homme, ne peut pas remplacer l'isoforme PLP dans le SNC (Stecca et al., 2000).

Le deuxième modèle souris a été obtenu par le même système de double recombinaison homologue. La différence résidait dans l'introduction d'une délétion de 105 paires de bases correspondant à l'ensemble de l'exon 3b à la place de l'introduction d'une mutation ponctuelle sur le site donneur d'épissage de l'exon 3b. Vers cinq ou six mois, ces animaux n'avaient pas d'atteinte de la myéline ou des axones, à la différence des animaux précédents (Spörkel et al., 2002). Cependant, les stades plus tardifs n'ont pas été rapportés.

(4) Les souris exprimant un ratio modifié de PLP/DM20

Une souris transgénique a été développée par une stratégie dite de «*hit and run*» pour reproduire, dans le gène murin, une mutation intronique observée chez l'Homme, correspondant à une délétion de 19 paires de base dans l'intron 3 du gène *PLP1*. Cette délétion induit chez l'Homme un phénotype modéré, marqué par une altération neurologique progressive associée à une myéline instable et une perte axonale (Hobson et al., 2002), en rapport avec une diminution d'expression de l'isoforme PLP au profit de l'isoforme DM20. De ce fait la séquence ciblée par la délétion est considérée comme un élément régulateur ISE favorisant l'épissage de l'isoforme DM20. Chez les animaux porteurs de cette délétion, l'augmentation habituelle d'expression de l'isoforme PLP au détriment de l'isoforme DM20 survenant au début de la myélinisation (jours suivant la naissance), ne se produit pas. Ces animaux qui expriment faiblement PLP à l'âge adulte ont des anomalies de compaction de la myéline et développent des discrets troubles moteurs tardifs sans dégénérescence axonale. Ces résultats, par comparaison aux animaux présentant une invalidation de l'isoforme PLP ou

des deux isoformes PLP/DM20, ont évoqué l'idée de fonctions indépendantes des produits d'expression du gène *Plp1*, d'une part dans la compaction de la myéline, dépendante du ratio PLP/DM20, d'autre part dans les interactions axone-OLs, dépendante de la présence ou non de l'isoforme PLP (Wang et al., 2008).

c. Les modèles de mères hétérozygotes transmettrices de Plp-pathies

Les modèles animaux de femmes hétérozygotes transmettrices de Plp-pathies ont été peu étudiés jusqu'à aujourd'hui, mais les rares études ont permis de préciser certains rôles de PLP.

- *Les femelles hétérozygotes du modèle de chien « shaking pup »* : Un intérêt de ce modèle animal est le fait que les femelles hétérozygotes présentent un phénotype malade transitoire marqué par des tremblements disparaissant vers l'âge de quatre à six semaines, se rapprochant des observations faites chez quelques filles atteintes de PMD. Les études électrophysiologiques montrent une perturbation transitoire des conceptions centrales qui s'améliorent au fil du temps. Les études neuropathologiques sur ces femelles hétérozygotes *shaking* ont permis d'identifier un mosaïcisme de la myéline et une quantité importante d'axones non myélinisés, chez les femelles les plus affectées, traduisant un retard de myélinisation, ainsi qu'une hypomyélinisation se corrigeant avec l'âge. L'analyse de l'ultrastructure des aires en mosaïque montre des OLs disséminés contenant un RER distendu intercalés entre les OLs normaux, confirmant la présence d'OLs mutants (Duncan et al., 1987a; Cuddon et al., 1998).

- *Les femelles hétérozygotes du modèle souris « jimpy »* : Ces femelles hétérozygotes sont moins affectées que les mâles, ont une durée de vie normale et présentent seulement un déficit en myéline précoce et partiel (30 à 40% de réduction), suivi d'une compensation progressive et d'une récupération complète de myéline après 5 mois (Vela et al., 1998). Ce modèle a permis d'étudier la plasticité des cellules neurogliales et les mécanismes pour compenser un déficit temporaire de myéline. Une hypothèse a été émise selon laquelle le nombre d'OLs chez ces femelles est augmenté, basée sur des données montrant une prolifération oligodendrocytaire augmentée mais une perte d'OLs peu élevée pendant le développement. Cependant, l'étude a montré un nombre d'OLs significativement réduit dans le funiculus dorsal et la SG, mais une quantité normale de myéline. Il est probable que certains OLs mutants du SNC de ces femelles assurent le maintien de plus de myéline que leurs homologues sauvages (Bartlett et Skoff, 1986, 1989; Kagawa et al., 1994b; Skoff et Ghandour, 1995; Edgar et al., 2002a).

▪ *Les femelles hétérozygotes du modèle souris « jimpy-rumpshaker »* : Elles semblent ne présenter aucune anomalie clinique, mais il existe d'importants changements morphologiques d'apparition tardive, notamment dans la ME. Dans la ME de ces souris, les principales caractéristiques sont : l'observation d'axones hypomyélinisés dispersés parfois regroupés par deux ou trois ; le nombre d'OLs légèrement élevé à tous les âges ; et une diminution de la quantité globale de myéline (Fanarraga et al., 1991; Edgar et al., 2002a). Ce modèle de souris hétérozygote est complètement différent d'autres modèles hétérozygotes pour des mutations de la myéline liées à l'X, tels que la souris *jimpy* ou le rat *md*, à la fois au regard de la sévérité des lésions et de l'incapacité de récupération avec l'âge.

▪ *Les femelles hétérozygotes du modèle rat « md »* : Ces femelles présentent un profil en mosaïque de myélinisation des nerfs optiques. Ce mosaïcisme est également observé dans la ME, mais à un moindre degré (Duncan et al., 1987a). Les nerfs optiques montrent un défaut de myélinisation sur toute leur longueur, mis en évidence par des plaques non-myélinisées, souvent clairement démarquées des aires adjacentes où les axones sont normalement myélinisés (Duncan et al., 1993).

▪ *Les femelles hétérozygotes du modèle souris invalidée pour Plp1* : Elles modélisent les mères transmettrices de SPG2. L'analyse de la myéline chez les femelles hétérozygotes invalidées pour *Plp1* a permis de montrer un effet compétitif entre les OLs sauvages et les OLs mutés, à l'avantage des premiers dans le SNC de ces animaux, traduisant le fait que PLP et DM20 ne sont pas indispensables à la survie des OLs mais que leur présence semble bénéfique au fonctionnement des OLs (Yool et al., 2001; Edgar et al., 2002a). Le marquage avec un anticorps PLP/DM20 de la ME de ces souris hétérozygotes révèle un mosaïcisme qui peut aller de simples plaques contenant de manière prédominante des gaines PLP-positives ou PLP-négatives, à des régions complètement entremêlées. On ne retrouve pas d'astrocytose dans les plaques de fibres PLP-négatives (Klugmann et al., 1997).

Les descriptions anatomiques de la ME de ces femelles montrent des résultats identiques aux souris mâles hémizygotes, avec des régions comprenant une gaine de myéline bien compactée associées à des aires d'apparence plus relâchée et des IPL souvent condensées (Klugmann et al., 1997).

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Mon travail de thèse s'articule autour de 2 hypothèses :

- (1) Il a été récemment suggéré que certaines pathologies touchant les sphères comportementales et cognitives, comme la schizophrénie, la maladie d'Alzheimer ou encore la maladie de Parkinson, présentent, en plus des anomalies biologiques propres à chacune, des altérations plus ou moins importantes de la SB.
- (2) Les PLP-pathies ont été longtemps considérées comme des pathologies de transmission récessive liée à l'X pour lesquelles seuls les garçons sont atteints. Il est depuis quelques années suggéré qu'il s'agit en fait plus probablement de formes dominantes liée à l'X d'expressivité variable chez les femmes hétérozygotes.

Les objectifs de mon travail de thèse émanant de ces deux hypothèses sont donc :

- (1) D'étudier le lien potentiel entre comportement et SB en s'intéressant à la relation inverse à savoir si, dans des modèles animaux de leucodystrophies dysmyélinisantes, les souris invalidées pour le gène *Plp1* modèles de SPG2, les altérations connues de la SB pourraient induire des anomalies comportementales et cognitives ? A cet objectif a été ajoutée une évaluation des troubles sensitifs dans ce même modèle.
- (2) D'évaluer les potentielles altérations comportementales des modèles murins de mères transmettrices de PMD et SPG2, à savoir les souris femelles hétérozygotes pour les mutations. Enfin, ce travail de caractérisation phénotypique des différents modèles animaux, nous a permis de mettre en évidence, différents marqueurs de la pathologie d'apparition plus ou moins précoce et d'expression stable au cours de la maladie. Ces marqueurs ont la particularité d'être très proches de ceux observés chez les patients porteurs des mêmes mutations. Ceci a conduit au dernier objectif de cette thèse.
- (3) Evaluer l'impact de traitements thérapeutiques sur ces marqueurs.

Pour répondre à ces objectifs, j'ai ainsi mené une étude longitudinale des mâles hémizygotes et des femelles hétérozygotes, avec une délétion du gène *Plp1* et sur-exprimant le gène *Plp1*, afin de mieux caractériser leurs réponses motrices, cognitives et sensitives et corrélérer ces observations à de potentielles altérations de protéines majeures du neuro-développement et de la fonction synaptique grâce à des analyses de biologie moléculaire et immunohistochimiques. Les mâles homozygotes surexprimant le gène *Plp1* n'ont pu être étudiés d'un point de vue sensitif et cognitif du fait des importantes altérations motrices qui les touchent très précocement.

J'ai choisi de présenter les résultats de mes travaux expérimentaux sous la forme de quatre articles, dont certains exigent cependant des approfondissements complémentaires:

- (1) La première étude porte sur l'analyse de l'hypersensibilité à la douleur chez les souris mâles hémizygotes *Plp* null, grâce à des explorations comportementales, électrophysiologiques, neuropathologiques et histologiques. Ce travail est terminé et va être prochainement soumis dans « The Journal of Neurosciences », dans la section « Neurobiology of Disease ».
- (2) La seconde étude s'intéresse à l'analyse des anomalies cognitives observées chez les souris mâles hémizygotes *Plp* null, d'un point de vue comportementale, électrophysiologique et histologique.
- (3) La troisième étude est axée sur une approche thérapeutique pharmacologique des anomalies comportementales observées chez les souris mâles hémizygotes *Plp* null, en évaluant les effets de l'administration chronique d'un antipsychotique atypique, la risperidone.
- (4) La dernière étude porte, quant à elle, sur l'investigation des anomalies comportementales motrices, cognitives et sensibles, chez les souris femelles hétérozygotes *Plp* null et surexprimant *Plp1*, respectivement modèles des mères transmettrices de SPG2 et PMD.

TRAVAIL

EXPERIMENTAL

Article 1

“Mechanism of hypersensitivity to thermal stimuli in mice with deletion of the major myelin protein”

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Article 1. “Mechanism of hypersensitivity to thermal stimuli in mice with deletion of the major myelin protein”

I. Présentation et méthodologie

Il est établi que les patients atteints de SPG2 présentent une dysmyélinisation accompagnée d'une dégénérescence axonale étendue et l'apparition d'importants troubles moteurs, comme une ataxie, puis une spasticité et une perte de la marche à environ 10 ans (Garbern et al., 1997, 2002). Tandis que les manifestations motrices ont été soigneusement étudiées, les anomalies sensibles liées à des mutations du gène *PLP1* ont reçues beaucoup moins d'attention alors qu'une neuropathie périphérique a parfois été observée (Garbern et al., 1999). Cependant, il est difficile d'évaluer précisément les caractéristiques sensibles des patients SPG2 dans des tests qui nécessitent certaines capacités de communication et aujourd'hui seules des observations cliniques concernent cet aspect sensitif (Boespflug-Tanguy, données personnelles).

La souris présentant une invalidation du gène *Plp1* (Plp null), modèle de SPG2 et développant de la même manière que les patients une dégénérescence axonale (Griffiths et al., 1998a; Edgar et al., 2004; Hassen et al., 2009) et d'apparentes anomalies de coordination motrices (Griffiths et al., 1998b; Yin et al., 2006), a donc servi de base à l'étude de potentielles altérations sensibles liées à la pathologie. En effet, l'absence de troubles moteurs précoces, nous a permis de d'évaluer précisément dans une étude longitudinale le profil et l'évolution temporelle du comportement sensitif chez ces souris.

Pour obtenir une évaluation complète des caractéristiques sensibles des souris Plp null, elles ont été soumises à 4 analyses distinctes :

- (1) une analyse comportementales, réalisée aux âges de 3, 6, 9, 12 et 15 mois, au cours de laquelle les animaux ont été soumis à un test de sensibilité douloureuse au chaud, le test d'immersion de la queue, et un test d'allodynie au chaud, le test de préférence de place thermique,
 - (2) une analyse électrophysiologique qui a permis de déterminer la vitesse de conduction des nerfs au niveau périphérique et central aux âges de 3 et 15 mois,
 - (3) une analyse histopathologique du nerf sciatique et de la ME à 3 et 15 mois,
 - (4) une analyse immunohistochimique de la corne dorsale de la ME à 3 et 15 mois,
- afin de mieux comprendre les relations entre comportement et changements neurobiologiques.

II. Résultats et discussion

1. Analyse comportementale

D'un point de vue comportemental, la comparaison des profils sensitifs des souris Plp null par rapport aux souris sauvages, a permis de déterminer pour la première fois l'apparition précoce d'un comportement douloureux chez ces souris. Les analyses ont mis en évidence une hyperalgésie thermique lors du test d'immersion de la queue dès l'âge de 3 mois, sans modification de la sensibilité dans le test d'allodynie au chaud. Ces résultats suggèrent que les souris Plp null présenteraient une hypersensibilité uniquement pour les stimuli douloureux.

2. Analyse électrophysiologique

Nous nous sommes ensuite intéressés à déterminer les anomalies physiopathologiques responsables de ces troubles du comportement sensitif. La réalisation de différentes mesures électrophysiologiques a permis de mettre en évidence des dysfonctionnements chez les souris Plp null, notamment une diminution des vitesses de conduction au niveau central et périphérique, associée à des anomalies de l'électro-neuro-myogramme (ENMG) concernant à la fois la composante sensorielle et musculaire. Les résultats de la mesure de vitesse de conduction du nerf de la queue ont montré que les souris Plp null développent avec l'âge une réduction de la vitesse de conduction sensorielle. L'enregistrement de l'ENMG permet de déterminer deux réponses : une onde initiale M, initiée par l'activation des axones moteurs, et une onde plus tardive H, initiée par l'activation synaptique des motoneurones des afférences musculaires via la voie du réflexe spinal. L'ENMG a permis d'identifier, chez les souris Plp null, une augmentation de la latence de l'onde M quel que soit l'âge testé et une augmentation de l'onde H seulement à 15 mois. En ce qui concerne les amplitudes des ondes M et H, il n'y a pas de différence entre les génotypes quel que soit l'âge testé. Dans les conditions normales l'amplitude de l'onde H est atténuée par une activation répétitive, ce qui est supposé être lié aux mécanismes pré-synaptiques et dépendre des contrôles descendants (Hosoido et al., 2009), ou bien représenter l'épuisement du pool de neurotransmetteurs à la synapse avec les motoneurones, un phénomène connu sous le nom de « *dépression post-activation* » (Palmieri et al., 2004). Les souris Plp null ne présentent pas de modification de la diminution de l'amplitude de l'onde H induite par des stimulations à fréquences croissantes, ce qui amène à supposer selon les 2 hypothèses citées, qu'elles ne présentent pas d'altérations des contrôles descendants ou de modification du pool de neurotransmetteurs à la synapse avec les motoneurones. De plus, la réalisation d'un protocole de seuil a permis de mettre en évidence l'apparition d'une réponse électrophysiologique pour un même seuil d'intensité de stimulation entre les génotypes.

Pour finir, l'évaluation des potentiels évoqués somesthésiques, à partir d'une stimulation à la base de la queue, a permis de détecter 2 ondes, une onde NI probablement initiée par la conduction des afférences musculaires de large diamètre et myélinisées de la racine dorsale, et une onde NII probablement initiée par la conduction le long de fibres ayant une vitesse de conduction légèrement moins rapide, comme les afférences cutanées également myélinisées mais de diamètre réduit. L'apparition de ces deux ondes est retardée chez les souris Plp null.

En résumé, lorsque l'on s'attarde sur la composante latence du profile électrophysiologique des souris Plp null, elles rassemblent beaucoup de caractéristiques décrites dans le cadre de désordres myéliniques du nerf périphérique (Zielasek et Toyka, 1999), tels qu'une augmentation des latences motrices ou une diminution des vitesses de conduction. Cependant, les souris Plp null ne présentent pas de claire diminution d'amplitude des potentiels évoqués, fréquemment considérée comme un marqueur de dysfonctionnement axonal. En plus, de l'altération périphérique, les souris Plp null développent également une anomalie de la conduction centrale marquée par l'augmentation des latences des potentiels évoqués spinaux, suggérant que ces souris souffrent d'une ganglionopathie.

3. Analyse histopathologique

L'histopathologie, et notamment l'analyse par microscopie électronique, sont particulièrement utiles pour déterminer les changements structuraux au niveau des axones ou de la gaine de myéline. Nous avons donc recherché si les altérations fonctionnelles détectées grâce aux analyses neurophysiologiques sont confirmées par la présence de changements morphologiques à différents sites du SNC et du SNP. L'analyse morphologique du nerf sciatique des souris Plp null ne révèle pas d'anomalies majeures sous-tendant les dysfonctionnements électrophysiologiques périphériques observés. De plus, si dans le SNC et notamment la ME, la dysmyélinisation associée à une dégénérescence axonale, déjà décrite précédemment, pourrait expliquer les altérations électrophysiologiques observées chez les animaux âgés, ce n'est pas le cas chez les souris de 3 mois où aucune anomalie morphologique n'est détectée (Griffiths et al., 1998b; Edgar et al., 2004; Hassen et al., 2009). Ces résultats montrent que dans le SNP et le SNC, les dysfonctionnements électrophysiologiques précèdent les anomalies neuropathologiques. Il a déjà été décrit que des réponses électrophysiologiques peuvent être altérées par des changements non structuraux ou de faibles changements structuraux indécélables histopathologiquement (Arezzo et al., 2011). Ces modifications peuvent être : (1) une composition ou une distribution spécifique des canaux ioniques le long de l'axone, (2) un dysfonctionnement du motoneurone plutôt qu'une

perte des corps cellulaires des motoneurones, ou encore (3) un dysfonctionnement du trafic axonal.

Il est important de noter que du point de vue des anomalies neuropathologiques du SNP, il y a un écart notable entre l'absence d'altérations chez les souris Plp null et les observations faites chez les patients SPG2, qui présentent une perte des fibres myélinisées de faible et gros calibre et une fibrose endoneurale, parfois accompagnés d'une dégradation de la gaine de myéline des fibres préservées et, une atrophie et une dégénérescence axonale (Garbern et al., 1997). Les raisons de ces différences entre notre modèle murin et les patients ne sont pas connues mais le premier article décrivant la souris Plp null postulait que PLP était plus important pour la stabilité de la myéline du SNC chez l'Homme que chez le rongeur, ce qui pourrait être également le cas pour le SNP (Klugmann et al., 1997).

4. Analyse immunohistochimique

Les résultats de l'analyse électrophysiologique ont invalidé les hypothèses selon lesquelles la réduction de la latence de retrait de la queue au test d'immersion de la queue serait dû à (1) une augmentation des vitesses conduction nerveuses motrices ou sensorielles, ou (2) une diminution du seuil d'activation à un stimulus douloureux. Une troisième hypothèse apparaît donc selon laquelle ce comportement sensitif pourrait être la conséquence d'une altération de l'intégration sensitive au niveau médullaire. Nous avons donc focalisé notre attention sur la corne dorsale de la ME, site d'intégration des informations sensibles. L'analyse immunohistochimique a révélé une importante prolifération astrocytaire et microgliale chez les souris âgées de 3 mois avec une aggravation avec l'âge. A 15 mois, l'astrogliose est associée à une surexpression du neuropeptide sensoriel CGRP associée à une diminution du nombre total de neurones sans réduction de la densité de marquage NeuN, suggérant d'une part, que les neurones préservés adoptent une morphologie « boursouflée » et d'autre part qu'au lieu de générer de nouveaux neurones CGRP, certains neurones présenteraient une modification d'expression protéique en se mettant à exprimer CGRP.

Les processus inflammatoires et la gliose réactive ont déjà été décrit comme contribuant à la douleur neuropathique dans de nombreux modèles (Tsuda et al., 2005; Olechowski et al., 2009; Hulsebosch et al., 2009) et la recherche consacrée à la douleur s'intéresse depuis peu à la contribution importante des cellules immunes et gliales dans les mécanismes de douleur chronique (Watkins et Maier, 2002; Marchand et al., 2005; Moalem et Tracey, 2006). Les cellules gliales réactives pourraient moduler l'excitabilité spinale et constituer le médiateur de l'hypersensibilité douloureuse via la production et la libération de cytokines et facteurs de croissance, tel que BDNF (pour « Brain derived neurotrophic factor ») (DeLeo et Yezierski,

2001; Coull et al., 2005). Il a également été démontré que certaines cytokines pro-inflammatoires seraient capables de sensibiliser les neurones nociceptifs, ainsi la modulation de la réponse inflammatoire pourrait influencer la réponse douloureuse. La sensibilisation des voies spinales de la douleur et le comportement d'hypersensibilité consécutif chez les souris *Plp* null pourraient donc être déclenchés par une augmentation de l'activité de ces cellules non-neuronales dans la corne dorsale de la ME (Colburn et al., 1999; Hains et Waxman, 2006). Une augmentation de l'expression de CGRP dans la corne dorsale a déjà été identifiée comme un important substrat anatomique de l'allodynie dans des modèles de lésion de la ME (Bennett et al., 2000). Les variations d'expression spinale de CGRP dans la corne dorsale des souris *Plp* null pourrait donc expliquer en partie les altérations sensorielles observées dans ce modèle. Les souris *Plp* null développent donc des anomalies sensitives, conséquences en partie des altérations de la composante gliale mais également des changements se manifestant dans la composante neuronale.

Une explication possible pour associer les résultats de diminution des conductions périphériques et centrales avec les résultats histologiques dans la ME, serait l'hypothèse proposée par K. Nave, selon laquelle l'hypomyélinisation et la diminution de la vitesse de conduction dans les longs axones, limitent la distance sur laquelle les neurones peuvent s'activer de manière synchronisée, perturbent la plasticité synaptique et détériorent ainsi l'intégration du signal (Nave, 2010). Tandis que cette hypothèse a été développée pour expliquer les déficits cognitifs observés dans les pathologies de la substance blanche, nos résultats suggèrent également sa validité dans les comportements sensitifs.

III. Conclusion et perspectives

Les souris *Plp* null représentent donc un très bon modèle pour étudier les dysfonctionnements sensitifs dus à une délétion du gène *Plp1* et pour mieux comprendre la physiopathologie de la SPG2. L'étude du comportement sensitif chez les souris *Plp* null pourrait être complétée afin de mieux définir la pathologie. Pour cela nous prévoyons de mieux caractériser le phénomène d'allodynie en soumettant les souris au test de Von Frey, permettant d'évaluer la sensibilité tactile des animaux en appliquant des filaments de tailles croissantes qui exercent une force sur la patte et obligent au retrait. Nous pourrions également évaluer la sensibilité des souris au froid, grâce au test consistant à appliquer de l'acétone sur la patte de l'animal ou le test de la plaque froide.

Cependant, cette étude a, d'ores et déjà, permis d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques d'apparition précoce pour évaluer l'effet de potentiels agents thérapeutiques qui amélioreraient la symptomatologie des patients SPG2. D'un point de vue de la compréhension

physiopathologique, deux sites importants dans la genèse et le traitement de l'information sensitive pourraient être impliqués dans les troubles comportementaux observés et n'ont pour le moment pas été étudiés : (1) les nerfs nociceptifs périphériques au niveau cutané, (2) les voies de contrôle descendantes de la douleur. Afin d'avoir une compréhension complète du phénotype de sensibilisation douloureuse chez les souris Plp null, ces deux sites doivent être étudiés.

Nous proposons comme perspective à ce travail l'identification de traitements pouvant améliorer ces troubles sensitifs. Une première approche potentielle serait l'utilisation de drogues commercialisées, comme des antidépresseurs, des antiépileptiques ou des opioïdes, qui constituent les traitements de référence des douleurs neuropathiques mais présentent souvent des effets secondaires importants (de Leon-Casasola, 2011). Parmi les antidépresseurs, le milnacipran, un inhibiteur de recapture de sérotonine/norepinéphrine a déjà prouvé son efficacité dans des conditions de douleur chronique, et particulièrement l'allodynie mécanique et au froid dans des modèles murins de douleur neuropathique (Berrocoso et al., 2011). En ce qui concerne les antiépileptiques, la gabapentine et pregabaline, agissant sur les canaux calciques, semblent être les plus efficaces de leur catégorie dans des modèles de douleur neuropathique (Abdi et al., 1998; Siddall et al., 2006). Une seconde approche serait d'évaluer l'efficacité de composés en développement, comme la molécule analogue du cholestérol, TRO19622, développée par l'entreprise Trophos. Cette drogue a déjà démontré des effets neuroprotecteurs dans un modèle de pathologie neurodégénérative, la sclérose latérale amyotrophique, en améliorant les performances motrices, retardant l'apparition de la maladie et augmentant la survie (Bordet et al., 2007). Mais il est intéressant de noter que ce traitement a également été efficace dans des modèles expérimentaux de neuropathie et de douleur diabétique (Bordet et al., 2008). Enfin, plus récemment, cette molécule a démontré des effets analgésiques et neuroprotecteurs dans un modèle de douleur neuropathique périphérique induit par un agent chimiothérapeutique, le paclitaxel, en réduisant l'hyperalgésie et l'allodynie mécaniques et en diminuant la dégénérescence de l'arborescence sensorielle terminale (Xiao et al., 2009).

IV. Article

Mechanism of hypersensitivity to thermal stimuli in mice with deletion of the major myelin protein

DEPIETS Bérengère^{1,4}, GIRAUDET Fabrice², BECHON Céline^{1,4}, BARDIN Laurent⁵, AVAN Paul², BOESPFLUG-TANGUY Odile^{3,4}, BEGOU Mélina^{1,4}

¹ University of Clermont-Ferrand, Medical faculty, Clermont-Ferrand, France

² Neuro-Dol, INSERM U1107, University of Clermont-Ferrand, Medical faculty, department of biophysics, France

³ CHU Robert Debré, reference center for "leukodystrophies", Paris, France

⁴ INSERM U676, Hôpital Robert Debré, Paris, France

⁵ Division of Neurobiology 2, Pierre Fabre research center, Castres, France

ABSTRACT

Deletion or truncation mutations in the proteolipoprotein 1 gene (*PLP1*) coding for the major central nervous system myelin protein PLP causes type 2 spastic paraplegia, which is a mild form of X-linked dysmyelinating disorder. While motor signs including ataxia and spasticity are the best known manifestations of this condition, somatosensory disturbances have also been reported but poorly characterized, notably because motor dysfunction strongly limits evaluation of somatosensory disorders, mostly based on reflex behavior in children and also because pain scales are difficult to apply to children and even more to “handicapped” children. We evaluated, in a longitudinal study, the somatosensory deficits of the *Plp1* gene-deleted mice (Plp null mice) which are a reliable model of the human pathology exhibiting late onset axonal degeneration associated with late motor symptoms. Results of behavioral study revealed that Plp null mice exhibit an early onset severe thermal hyperalgesia that is not associated to change in thermal allodynic behavior. Electrophysiological testing showed a decrease in peripheral and spinal conduction velocity associated with electro-neuromyographic abnormalities. Morphological analysis of sciatic nerve and spinal cord showed that, peripheral nerve fibers organization is preserved even in old mice, while the lack of PLP is known to be associated to axonal degeneration and myelin abnormalities in the central nervous system. Finally, immunohistochemical analysis of the spinal cord dorsal horn revealed an early onset astroglial proliferation worsening with age leading to perturbation of sensory neuropeptides expression. Taken together, these results strongly suggest that Plp null mice suffer from ganglionopathy, associated with central demyelination but few peripheral nerve alterations, probably induced by glial mediated spinal cord sensitization. The development of new drugs targeting this kind of abnormalities might thus represent a crucial or major issue to improve the quality of life of patient with SPG2. This mechanism of central sensitization due to astrogliosis could be a more general mechanism implicated in other leukodystrophies such as Alexander disease or megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts as well as in other non-genetic demyelinating diseases such as multiple sclerosis.

1. Introduction

The central nervous system (CNS) white matter (WM) is a complex structure composed of a vast number of axons sheathed in a compact lipid-rich membrane, the myelin sheath, which is synthesized by oligodendrocytes. The myelin proteolipid protein gene (PLP1), located on the X-chromosome, undergoes alternative splicing to produce the most abundant proteins of CNS myelin i.e. full length PLP and the shorter DM20 isoform. While PLP is the predominant isoform expressed in the myelinating and post-myelinating mammalian CNS, DM20 is detected at earlier stages of myelination (Baumann and Pham-Dinh, 2001). PLP is almost 100 % conserved across mammalian species, and naturally occurring mutations in the PLP1 gene are associated with dysmyelinating disorders both in humans and in lower vertebrates including mouse, rat, and dog (Duncan et al., 2011). The genetically modified mice in which the *Plp* gene is inactivated (*Plp* null mice) (Klugmann et al., 1997) have an age- and length-dependent degeneration of long spinal tracts with axonal swellings of small-diameter axons (Griffiths et al., 1998b; Garbern et al., 2002). After an initial description of rather normal-looking CNS myelin sheaths with only intraperiod lines abnormalities (Klugmann et al., 1997), others subtle myelin defects were subsequently reported in older *Plp* null mice (Rosenbluth et al., 2006). Abnormalities in compaction as well in alignment of the radial component of the spinal cord and optic nerve myelin seem to participate in the axon damage (Rosenbluth et al., 2006). More recently, abnormal myelin compaction and axonal defects has been confirmed *in vivo* using quantitative magnetic resonance imaging (Hassen et al., 2009). While histo-pathological abnormalities have been extensively described in *Plp* null mice, behavioral studies are very poor and concern only rotarod performance exploration, showing late onset coordination defects (Griffiths et al., 1998a, 1998b).

In human, deletion of the *PLP1* gene leads to a late onset dysmyelination associated with an ascending axonopathy, called spastic paraplegia type 2 (SPG2) (Cailloux et al., 2000; Inoue, 2005). The lack of *PLP1* gene expression is responsible for a dysmyelination process in which oligodendrocytes, although in normal number, produce a less stable and compact myelin sheath associated with extensive axonal degeneration (Garbern et al., 1997, 2002). In affected patients, the motor milestone of the first year of life is not impaired but progressive gait abnormalities appear in the five following years, leading to severe spasticity and loss of ambulation at puberty. *Plp* null mice thus represent a very useful and compelling model of SPG2 and have largely contributed to our understanding of PLP related disorders (Gruenenfelder et al., 2011). Dysmyelination and axonal degeneration observed in *Plp* null mice also represent a model for assessing the disorder of axono-glial interactions, which is one of the causing factors of demyelination in multiple sclerosis.

Compelling data argue for the presence of pain or somatosensory dysfunctions in patients with primary myelin disease. This is the case for SPG2 patients based on clinical observations of pain sensitization notably after surgery (Boespflug-Tanguy O, personal data) and on description of peripheral neuropathy (Garbern et al., 1999). This is also the case in patients with multiple sclerosis, for whom motor dysfunctions are the main clinical signs and are often associated with sensitive complains (Michalski et al., 2011; Solaro and Uccelli, 2011).

We then decide to investigate carefully the sensitive abnormalities related to PLP null expression, by initiating a study on pattern and temporal evolution of sensitive behavior in Plp null mice. We performed a longitudinal study to assess behavioral changes in pain sensitivity to noxious heat stimuli and heat and cold allodynia in Plp null mice. In addition, we also carried out an electrophysiological evaluation of peripheral and central conduction and a neuropathological analysis of sciatic nerve and spinal cord. Finally, we performed immunohistochemical analysis in the spinal dorsal horn of Plp null mice, to gain a better understanding of the relationship between behavioral and neurobiological changes.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male mice with deletion of *Plp1* gene (Plp null mice) and their wild-type (WT) littermates were generated as previously described (Klugmann et al., 1997). Plp null mice were bred for 15 generations into the C57BL/6N background using mice from the breeding colony of the Max Planck Institute of Experimental Medicine and then transferred to our animal facility (kind gift from Pr K.A. Nave, Gottingen Germany). Genotyping was performed as previously described (Klugmann et al., 1997). Mice were housed eight per cage in a temperature (22 °C) controlled environment under a 12:12 light/dark cycle (light from 7:00 AM. to 7:00 PM.), with *ad libitum* access to pellets (Harlan, Gannat, France) and water. Experiments were performed in accordance with French and European Economic Community guidelines for the care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering (86/09/EEC–Council Directive of 24 November 1986).

2.2. Behavioral testing

2.2.1. Thermal hyperalgesia: Tail flick test

Level of heat pain sensitivity was evaluated in the tail flick test. The mouse was maintained in a towel to only let the tail appearing. It consists to immerse the distal part of the mouse tail in warm water at 46°C, 48°C or 52°C. Before the test, a habituation session was necessary to familiarize mice with the contention and the tail immersion to avoid stress due to manipulation. The habituation consisted in 4

trials on 4 consecutive days in which the latency between immersion in 46°C water and the fast withdrawal of the tail was manually recorded. To avoid tissue lesions, a time cut-off was set at 30 seconds of tail immersion. After each trial, the mouse tail was dried and the animal was removed in the home cage for an inter-trial interval (ITI) of 15 minutes. The test phase in the 46°C condition was performed in same conditions on the fifth day immediately after the habituation session. 48°C and 52°C conditions were realized consecutively and each required only one day of habituation. The test phases consisted also in 4 trials with an ITI of 15 minutes and results are expressed as the mean of the 4 trials. For each genotype, 14 mice were tested every three months from 3 to 15 months.

2.2.2. Thermal allodynia: Thermal place preference test

The thermal place preference test enables to evaluate the heat/cold allodynic sensitivity of mice. Two hot/cold analgesia plates (34 cm long x 8 cm wide) (Bioseb, Paris, France) were placed side by side such that the adjacent thermal surfaces were enclosed in a single chamber of transparent Plexiglas (34 cm long x 16 cm wide x 25 cm high). The temperature of each plate was controlled at $\pm 0.1^\circ\text{C}$. The choice of temperatures was determined in accordance with literature (Shimizu et al., 2005; Noël et al., 2009). To evaluate heat allodynia, mice were tested on 3 sessions, each during 5 minutes. In the habituation session, plates were both at 34°C. In the second session only the plate 1 was adjusted at 38°C, the plate 2 remaining at 34°C. In the third session plate 1 was adjusted at 42°C, plate 2 remaining at 34°C. The freely movements of the mice between the two plates were recorded with a videotracking system (Viewpoint, Lyon, France) over 5 minutes by recording the cumulative time spent and the distance travelled on each plate. Results are presented as the percentage of time spent on the plate 2 (habituation temperature: 34°C) compared to the plate 1 (modified temperature: 34°C versus 38°C and 42°C according to the different sessions) and the cumulative distance travelled. For each genotype, 14 mice were tested every three months from 3 to 15 months.

2.3. Electrophysiology

All electrophysiological tests were performed under standard conditions in a sound attenuated and electrically shielded recording chamber. Recording were performed under levels of general anesthesia with ketamine chlorhydrate and chlorobutanol (Imalgene®, Merial, Lyon, France) and diazepam (Valium®, Roche, Basel, Switzerland) (1 mL/kg of a solution containing 11.25 mg Imalgene® and 0.375 mg of diazepam; intraperitoneally), a procedure previously demonstrated as not affecting significantly peripheral nerve velocities (Ho et Waite, 2002). During the tests, core body temperature was continuously measured with a rectal probe (Microprobe Thermometer, BAT-12, WPI, Sarasota, USA)

and strictly maintained constant at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ with a thermostated heating pad (Homeothermic Blanket System – Harvard Apparatus, Holliston, USA). For each genotype, 7 mice were evaluated at 3 and 15 months of age.

Electro-neuro-myogram (ENMG) recordings, sensory nerve conduction velocities (NCV) and spinal somatosensory evoked potentials (SEP) were recorded by stimulating the caudal nerve (for NCV and spinal SEP) and the plantar nerve (for ENMG) by using a Neuropack μ MEB-9100 recording device (Nihon Koden, Tokyo, Japan) and needle electrodes (stainless steel, diameter: 0.4 mm, Medtronic Xomed Inc, Minneapolis, USA).

2.3.1. Caudal sensory nerve conduction velocity

Animals were positioned ventrally for their tail to be completely loose and the tail was cleaned and fat freed with alcohol at 70%. Caudal NCV was determined by placing a couple of recording needle electrodes at the base of the tail and a couple of stimulating tail tip needle electrodes 60 mm distally to the recording points. A ground needle electrode was inserted between the stimulating and recording electrode needles. Sensory NCV was recorded according to orthodromic conduction (duration: 0.1ms; intensity 0-1 mA, by steps of 0.1, high-pass filter: 2 Hz; low-pass filter 5 kHz). Caudal NCVs were calculated by measuring the latency between the stimulus artifact and the peak of the elicited action potential divided by the distance (60 mm) between the recording and the stimulating points. Five responses were averaged for each recording.

2.3.2. Electro-neuro-myogram recordings: “H reflex”

For H-reflex recording, we employed the non-invasive recording method introduced by Ho and Waite, which consist of stimulating tibial nerve at the ankle (Ho and Waite, 2002). Compound muscle action potentials (CMAPs) of hindpaw (plantar muscles), including the direct muscle response (M wave) and the monosynaptic reflex response (H wave), were recorded by means of needle electrodes. For this, an active recording needle electrode is positioned in the plantar muscles (between the second and third cuneiform bones) and a reference electrode is inserted subcutaneously in the third toe. A ground electrode is inserted into the base of tail. The signals from the recording electrode were filtered (2Hz high pass and 5 kHz low pass). Electrical stimulation was applied to the plantar nerve percutaneously through a pair of needle electrodes placed at the ankle (at the Achilles tendon). The CMAPs was evoked by square stimulating electrical pulses of 0.1ms duration. First, CMAPs was tested at 1Hz (1 per second) to determine M and H waves thresholds with gradually increasing intensities (by steps of 0.1mA until an intensity of 1mA) (threshold protocol). An average of 5 consecutive responses was recorded for

each of stimulus intensities. Averages of 5 consecutive responses, with 1mA electrical stimulation, were also recorded at each of the following frequencies: 0.1, 1, and 5Hz (adaptive protocol). The latencies of M- and H-waves were measured as time elapsed between stimulus artifact and peak of each waveform. The amplitudes of M- and H-waves were measured between the baseline before the stimulation and the peak of each waveform. CMAP results are presented as the average of the 5 consecutive responses evoked by 1mA stimulation at 1Hz.

2.3.3. Spinal somatosensory evoked potential

In this study, we used the same protocol as that described by Chandran et al., except for the stimulation site, which was at the base of the tail and not at the tibial nerve (Chandran et al., 1994). Under deep anesthesia, the back of the animals was shaved and disinfected. A longitudinal midline incision was made through the skin. The electrical stimulation (square pulses, 0.1ms, 1mA, 1Hz) was delivered through a couple of stimulating needle electrodes at the base of the tail. The spinal SEP recording (average 20 consecutive responses, high-pass filter: 2Hz; low-pass filter: 5kHz) was done by needle electrodes gently inserted in the paravertebral muscle at about 40 mm distal to the active stimulating electrodes (high lumbar level). The ground electrode was inserted subcutaneously between the stimulating and recording electrodes. The latencies of N1- and N2-waves were measured as time elapsed between stimulus artifact and peak of each waveform. The amplitudes of N1- and N2-waves were measured between the baseline before the stimulation and the peak of each waveform.

2.4. Morphological analysis of sciatic nerves and cervical spinal cord

Four 3- and 15-month-old Plp null and WT mice were sacrificed under pentobarbitone anesthesia by perfusion (peristaltic pump, rate of 20 mL/min for 5 min) through the left ventricle of freshly prepared 4% paraformaldehyde (PFA) and 2.5% glutaraldehyde fixative solution in 0.1M phosphate buffered saline (PBS). Sciatic nerve and spinal cord were removed and kept overnight at 4°C in the same fixative solution used for animal perfusion and then stored at 4°C in 4% PFA during less than 1 month. For semi-thin sectioning, sciatic nerve and 2 mm sections of cervical spinal cord were extensively washed with sodium cacodylate and then were post-fixed in 1% osmium tetroxide during 1h. Afterward, sections were dehydrated in alcohols and acetone. After embedding in epoxy resin, 700 nm thin coronal sections were performed and stained with toluidine blue. Seventy-nanometer ultrathin sections stained with uranyl acetate and lead citrate were also examined in a transmission electron microscope (Hitachi H7650, Tokyo, Japan), 80kV.

2.5. Immunohistochemistry

Eight 3- and 15-month-old Plp null and WT mice were anesthetized with pentobarbital and sacrificed by transcardiac perfusion with 4% PFA freshly prepared in 0.1M PBS. The spinal cord was entirely removed; the cervical part was sampled and included in 6% agarose. 20 μ m slices were realized with a Vibratome HM 650V (Microm, Francheville, France). Immunohistochemistry was performed on histological sections (6-10 spinal cord dorsal horn per mice). Cell distribution was evaluated using, at 4°C overnight, the following primary antibodies: goat anti-calcitonin gene-related peptide (CGRP at 1:600, Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-galanin (at 1:1500, Millipore, Temecula, USA), goat anti-ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1 at 1:1000, Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP at 1:4000, Millipore, Temecula, USA), mouse anti-myelin basic protein (MBP at 1:1500, Millipore, Temecula, USA) and mouse anti-neuronal nuclei (NeuN at 1:1000, Millipore, Temecula, USA). Following 3 consecutive 15-minutes washes in PBS triton 0.3%, sections were incubated in dedicated biotinylated secondary antibodies (1:5000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) for 2h at room temperature. After washing, the sections were processed for 1h using a standard Vectastain ABC kit (Vector laboratories, Burlingame, USA). Staining was visualized with diaminobenzidine (DAB, Vector laboratories, Burlingame, USA) as a chromatic agent. Control slices were incubated as described above, without primary or secondary antibodies. No immunoreactivity was seen in controls (data not shown).

Histological sections were examined using optic microscope BX51 (Olympus, Southend-on-Sea, UK) at magnifications x10 and x4. Digital images were captured with CCD digital camera (Roper Scientific GmbH, Ottobrunn, Germany) using Metamorph version 6.2 software (Roper Scientific GmbH, Ottobrunn, Germany). All images analysis and quantifications were performed on pictures using ImageJ software (ImageJ 1.44, National Institutes of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Dorsal horn was manually delimited and positive pixels of this region of interest were determined using the “threshold” tool of the software. The total number of positive pixels was reported to the total number of pixels for each slice and averaged per animal. This percentage of immunoreactive area is presented as mean \pm standard error of the mean. The more delineated presentation of the NeuN immunoreactivity allows us to perform a quantification of the number of positive cells using the “analyze particles” tool of ImageJ. For a precise comparison between WT and transgenic mice, in each staining, we checked and validated that the manually delimited surfaces of dorsal horn had similar sizes (data not shown).

2.6. Statistical analysis

For behavioral analysis data were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, with the age (months) as the within-subjects (i.e. repeated) factor, and the genotype (Plp null mice/WT) as the between-subjects factor. Post-hoc comparisons were carried out with Fisher's PLSD post hoc tests for multiple comparisons, at each time point, between Plp null and WT mice.

For electrophysiological analysis, a non-parametric analysis was performed using the Mann-Whitney test to evaluate the genotypes effect at the different time points or the time effect for the different genotypes.

For immunohistochemical study, student-*t*-test was realized to compare the percentage of immunoreactive area or the number of immunostained cells between Plp null and WT mice for the different antibodies used.

All the statistical analyses have been realized using the Statview software (SAS institute Inc, Cary, NC). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Plp null mice exhibit thermal hyperalgesia

We first assessed whether there were any changes in the heat pain sensitivity of Plp null mice in the tail flick test. At 46°C, Plp null mice exhibited a significant decrease in their withdrawal latencies compared to WT mice. The two-way ANOVA analysis revealed a significant main effect of age [$F(4,130)=4.52$, $p < 0.01$] and genotype [$F(1,130)=17.48$, $p < 0.001$] and no significant age x genotype interaction [$F(4,130)=0.37$, $p > 0.05$]. At all ages tested, although a tendency was observed, post-hoc analysis revealed only a significant decrease in the withdrawal latencies in 6-month-old Plp null mice compared to WT mice ($p < 0.05$, PLSD Fisher test) (Figure 1A).

Similarly, at 48°C and 52°C, the two-way ANOVA analysis revealed a significant main effect of age [$F(4,130)=14.22$, $p < 0.001$ and $F(4,130)=30.68$, $p < 0.001$, respectively] and genotype [$F(1,130)=82.99$, $p < 0.001$ and $F(1,130)=67.68$, $p < 0.001$, respectively] and no significant age x genotype interaction [$F(4,130)=0.60$, $p > 0.05$ and $F(4,130)=0.48$, $p > 0.05$, respectively]. Post-hoc analysis revealed that Plp null mice exhibited a significant decrease in their withdrawal latencies at all tested ages compared to WT mice ($p < 0.01$, PLSD Fisher test), excepted at 3 months for 52°C, where a slight but no significant decrease was observed (Figure 1B and 1C).

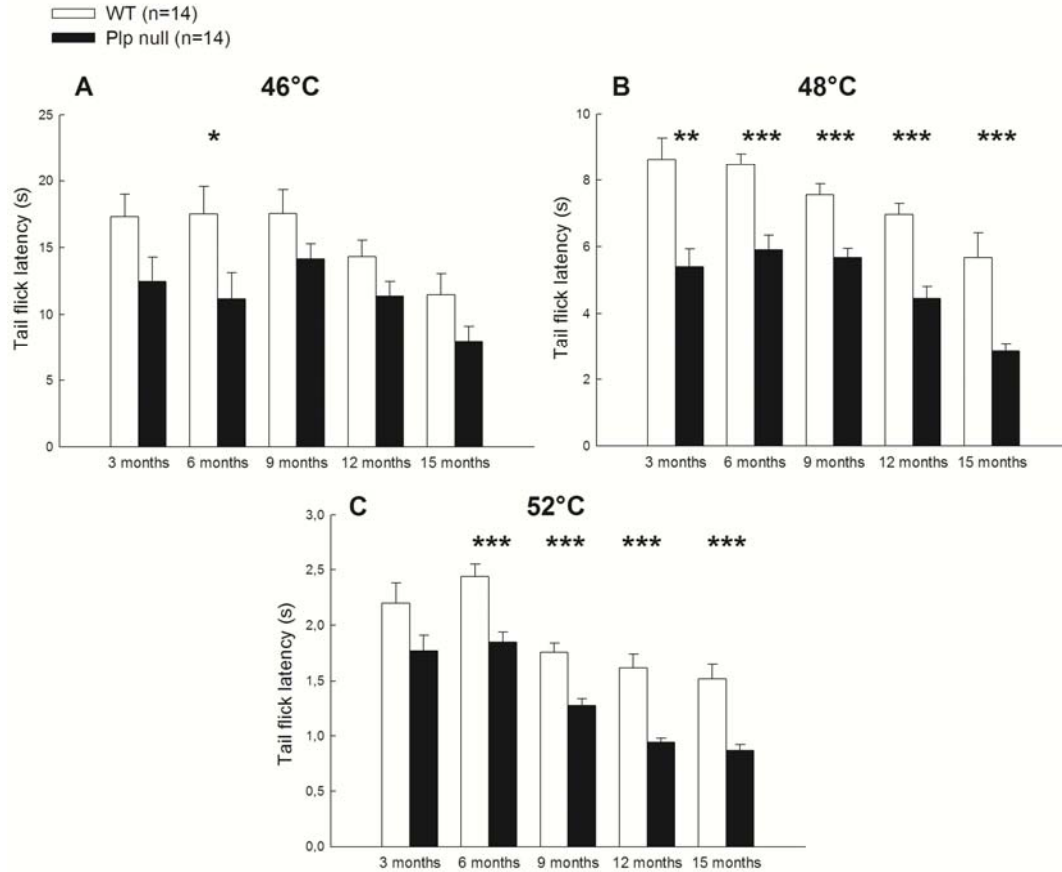


Figure 1. Evaluation of thermal hyperalgesia in wild-type (WT) and Plp null mice using the tail flick test.

(A) At 46°C, Plp null mice exhibit a slight decrease in tail flick latencies at all ages but only significant at 6 months of age.

(B) At 48°C, Plp null mice exhibit an important decrease of tail flick latency compared to WT mice at all tested ages.

(C) At 52°C, Plp null mice exhibit significant decrease in latencies at all ages except at 3 months of age.

Results are expressed as mean value \pm SEM (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001, PLSD Fisher test).

3.2. Plp null mice exhibit no thermal allodynia

To characterize more precisely the thermal sensitivity of our model, Plp null mice were submitted to thermal place preference tests to evaluate their sensitivity to heat allodynic stimuli.

In evaluation of heat allodynia, when the 2 plates have the same temperatures (34 vs. 34°C), the two-way ANOVA analysis revealed no difference between genotypes [$F(1,130)=0.23$, $p>0.05$] nor ages [$F(4,130)=1.56$, $p>0.05$] and no age x genotype interaction [$F(4,130)=1.10$, $p>0.05$] concerning the time spent on each side (Figure 2A). Whatever the age tested, as the variable temperature plate was heated at 38°C, Plp null and WT mice showed a slight preference for the 34°C side, while this preference was clear when the variable temperature plate was heated at 42°C. The two-way ANOVA analysis revealed no difference between genotypes [$F(1,130)=1.64$, $p>0.05$ and $F(1,130)=0.02$, $p>0.05$ in conditions 34°C vs. 38°C and 34°C vs. 42°C respectively] and no age x genotype interaction [$F(4,130)=2.26$, $p>0.05$].

and $F(4,130)=0.26$, $p>0.05$ in conditions 34°C vs. 38°C and 34°C vs. 42°C respectively]. A slight difference between ages was observed only in conditions 34°C vs. 38°C [$F(4,130)=4.06$, $p<0.01$] (Figure 2B-2C).

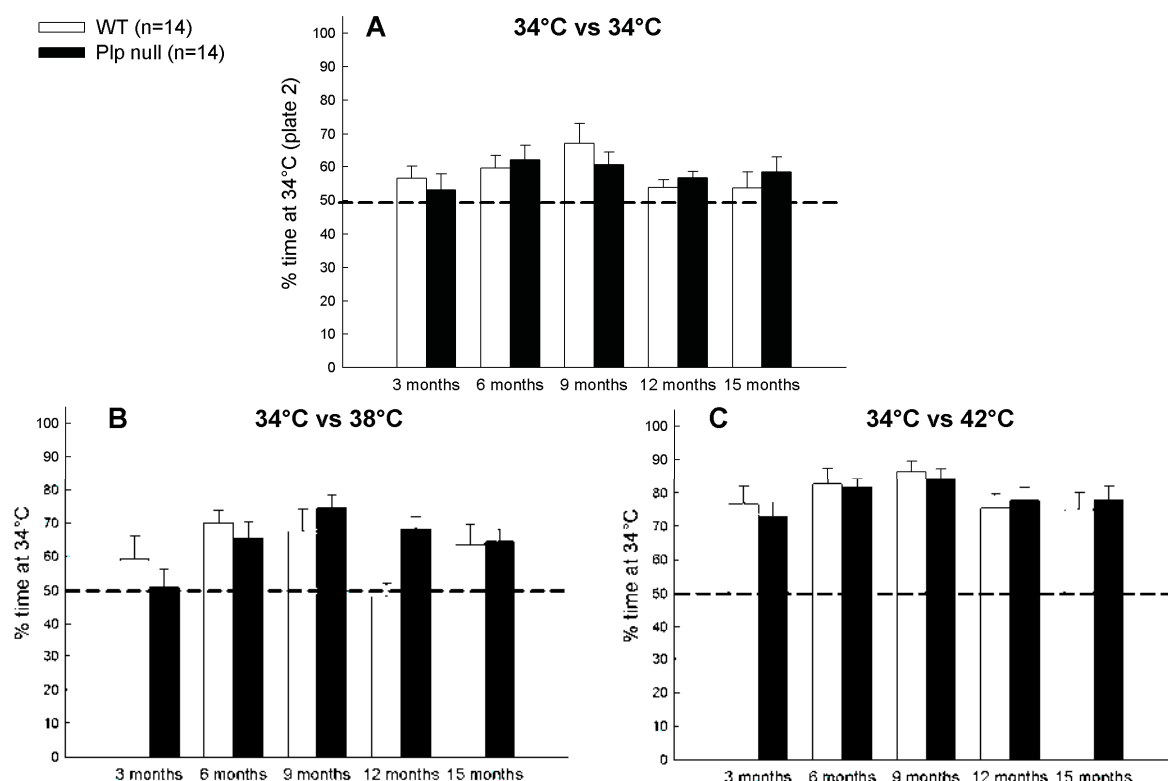


Figure 2. Evaluation of heat allodynia sensitivity in wild-type (WT) and Plp null mice

(A) Habituation session with the two plates at same temperature show that mice had no preference for any plate.

(B) In condition 34°C vs. 38°C , no change in thermal allodynia between genotypes.

(C) In condition 34°C vs. 42°C , no change in thermal allodynia between genotypes.

Results are expressed as mean value \pm SEM.

3.3. Electrophysiology

3.3.1. Decrease in caudal nerve conduction velocity in Plp null mice

We then assessed the electrophysiological responses of the Plp null mice, focusing first on peripheral conduction velocity (Figure 4). The Mann-Whitney analysis revealed a significant decrease of the caudal NCV in 15-month-old Plp null mice compared to WT mice ($p=0.01$, Mann-Whitney test). At 3 months, we observed also a decrease of the NCV but this difference didn't reach significant level ($p=0.07$, Mann-Whitney test). Whatever the genotype, there was no time evolution in the NCV between 3 and 15 months ($p>0.05$, Mann-Whitney test).

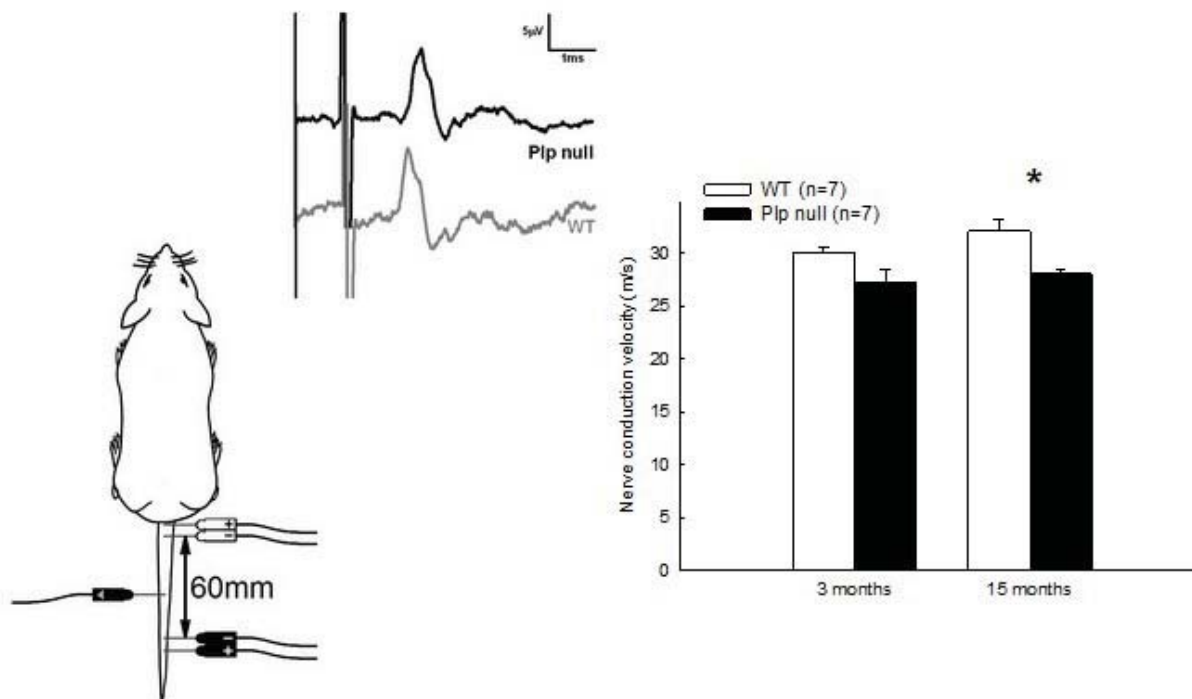


Figure 4. Caudal nerve conduction velocity (NCV) in wild-type (WT) and Plp null mice aged of 3 and 15 months.

Compared to WT mice, Plp null mice exhibit a statistically reduced caudal nerve velocity only at 15 month of age.

Raw data were obtained in 15-month-old Plp null and WT mice.

Results are expressed as mean value \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Mann-Whitney test).

3.3.2. Increase in M and H waves latencies in electro-neuro-myogram in Plp null mice

The latency of the muscular response was significantly increased (M wave) for Plp null mice compared to WT mice aged of 3 and 15 months ($p = 0.007$ and $p = 0.013$ respectively, Mann-Whitney test) whereas, the latency of the sensitive response (H wave) showed a significant increase in Plp null mice compared to WT mice only at 15 months ($p = 0.002$, Mann-Whitney test) (Figure 5). Correlation between latency and age showed only a statistically significant increase in the M wave latency of WT mice between 3 and 15 months of age ($p = 0.009$, Mann-Whitney test). In contrast, no difference in the amplitude of the M or H waves was observed between genotypes or between ages ($p > 0.05$, Mann-Whitney test) (Table 2).

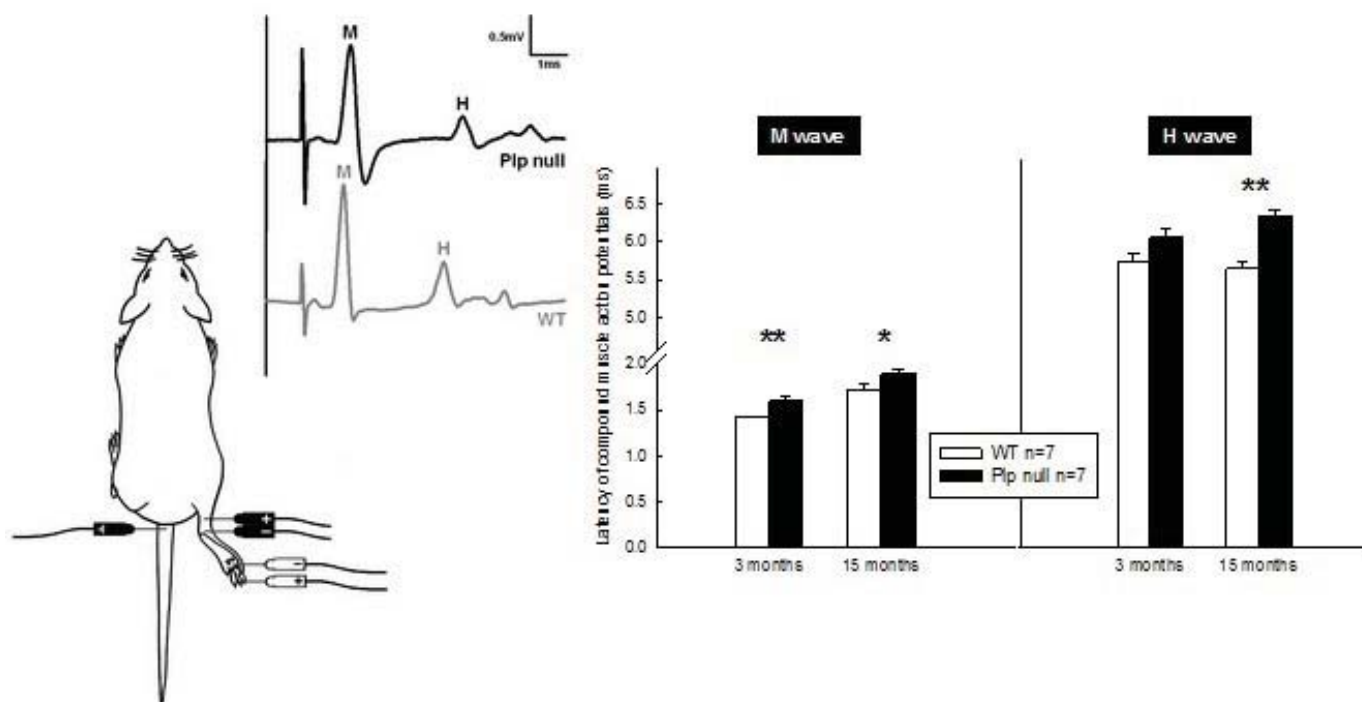


Figure 5. Latencies of the muscular (M) and sensitive component (H) of the electro-neuro-myogram (ENMG) in wild-type (WT) and Plp null mice aged of 3 and 15 months.

At 3 months, Plp null mice exhibited a longer latency only of M waves, whereas at 15 months of age both M and H waves latencies were increased.

Raw data were obtained in 15-month-old Plp null and WT mice.

Results are expressed as mean value \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Mann-Whitney test).

	Amplitudes of waves (mV)					
	M			H		
	WT (n=7)	Plp null (n=7)		WT (n=7)	Plp null (n=7)	
3 months	1.11 \pm 0.28	1.44 \pm 0.49	NS	0.16 \pm 0.05	0.33 \pm 0.12	NS
15 months	1.11 \pm 0.26	1.09 \pm 0.20	NS	0.28 \pm 0.07	0.36 \pm 0.10	NS

Table 2. Amplitudes of the motor (M) and sensitive (H) waves of the electro-neuro-myogram in wild-type (WT) and Plp null mice age of 3 and 15 months.

No difference in the amplitude of the M or H waves was observed between genotypes or between ages.

Results are expressed as mean value \pm SEM (NS: non-significant, Mann-Whitney test).

The threshold protocol with stimulations of gradually increasing intensities (by steps of 0.1 mA from 0 until an intensity of 1mA) did not show difference between genotypes in 3- and 15-month old mice. The first evoked responses (M and H waves) were observed in both genotypes at 0.2 mA and 0.3 mA in 3-

and 15-month-old mice, respectively, and all mice exhibited evoked responses at 0.5 mA stimulation (data not shown).

The adaptive protocol with stimulations of gradually increasing frequencies (0.1, 1, and 5 Hz) did not show difference between genotypes in 3- and 15-month-old mice ($p>0.05$, Mann-Whitney test). Under normal conditions, the amplitude of the H wave is attenuated by repetitive activation. At 3 months of age H wave amplitudes evoked by 1 Hz and 5 Hz stimulations rates were $56.4\pm 10.1\%$ and $44.9\pm 11.1\%$ of those evoked by 0.1 Hz stimulation in WT mice and 79.0 ± 8.8 and 32.4 ± 5.1 in Plp null mice. At 15 months of age, these percentages increased to $82.7\pm 9.4\%$ and $50.2\pm 5.2\%$ in WT mice versus 97.0 ± 8.2 and 57.5 ± 2.5 in Plp null mice (data not shown).

3.3.3. Alterations in spinal somatosensory evoked potentials in Plp null mice

The Mann-Whitney analysis revealed a significant increase of the spinal N1 SEP peak latency in 15-month-old Plp null mice compared to WT mice ($p=0.02$, Mann-Whitney test), whereas at 3 months this difference did not reach significance level ($p=0.09$, Mann-Whitney test). There was also an increase of the spinal N2 SEP peak latency in Plp null mice at 3 and 15 months of age ($p=0.007$ and $p=0.008$ respectively) compared to WT mice. If the peak latencies of the N1 and N2 components remained identical between 3 and 15 months in WT mice, they increased during the same period in Plp null mice (N1 $p=0.002$ and N2 $p=0.003$, Mann-Whitney test) (Figure 6).

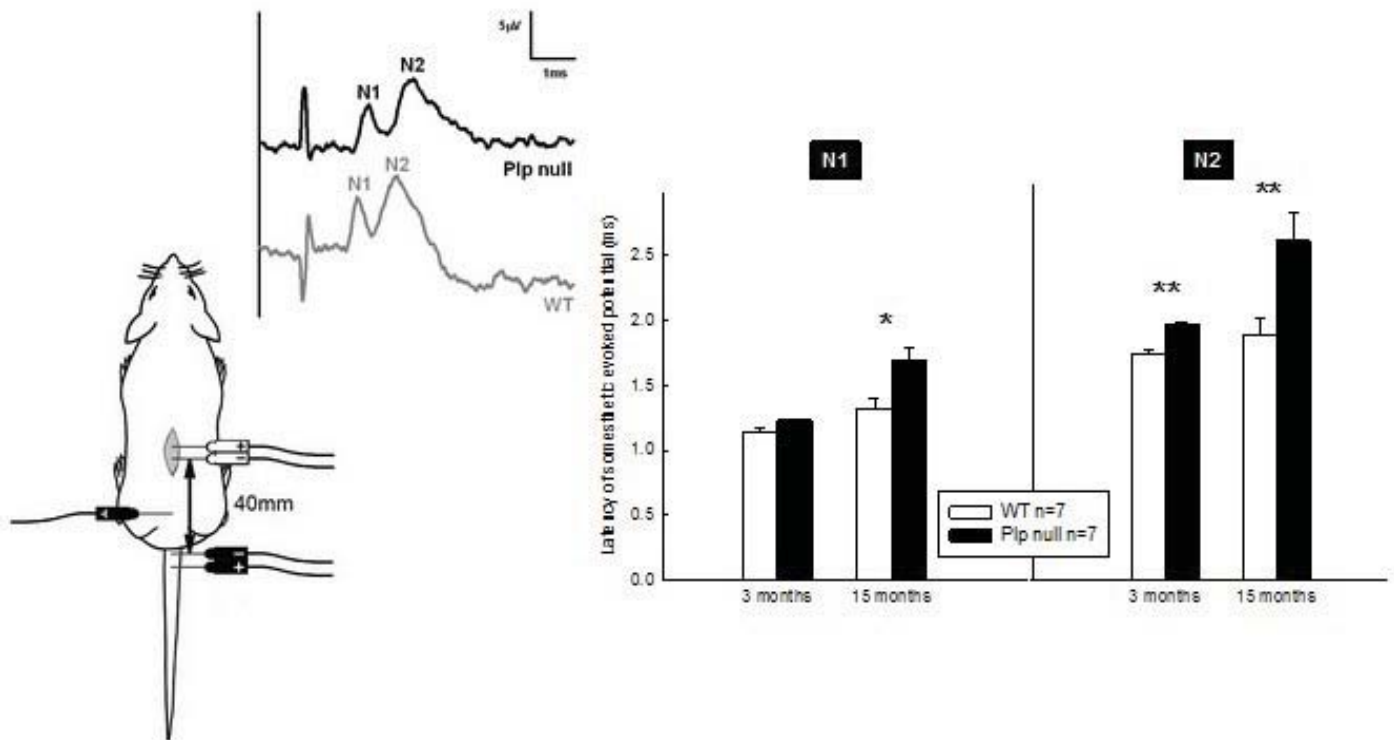


Figure 6. Latencies of the N1 and N2 components of the spinal somatosensory evoked potentials (spinal SEP) in wild-type (WT) and Plp null mice aged of 3 and 15 months.

At 3 months, Plp null mice exhibited a longer latency only of N2 waves, whereas at 15 months of age both N1 and N2 waves latencies were increased.

Raw data were obtained in 15-month-old Plp null and WT mice.

Results are expressed as mean value \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Mann-Whitney test).

Mann-Whitney analysis revealed no difference in the amplitude of the N1 components of the spinal SEP between genotypes and an increase in the amplitude of the N2 components in Plp null mice only at the age of 3 months ($p = 0.02$, Mann-Whitney test). Correlation between amplitude and age revealed only a significant decrease for the N2 component in Plp null mice between 3 and 15 months of age ($p = 0.006$, Mann-Whitney test) (Table 3).

	Amplitudes of waves (μV)					
	N1			N2		
	WT (n=7)	Plp null (n=7)		WT (n=7)	Plp null (n=7)	
3 months	7.01 \pm 1.51	10.26 \pm 1.25	NS	7.84 \pm 1.51	15.86 \pm 2.94	*
15 months	5.90 \pm 0.59	7.67 \pm 1.04	NS	5.29 \pm 0.87	6.06 \pm 0.61	NS

Table 3. Amplitudes of the N1 and N2 components of the spinal somesthetic evoked potentials (spinal SEP) in wild-type (WT) and Plp null mice at 3 and 15 months.

Statistical analysis revealed only an increase in the amplitude of the N2 components in Plp null mice at 3 months of age.

Results are expressed as mean value \pm SEM (NS: non-significant, * $p < 0.05$ Mann-Whitney test).

3.4. Morphological analysis of sciatic nerves and cervical spinal cord

Semi-thin toluidine blue-stained cross section of sciatic nerves revealed that myelin thickness and axonal organization, as well as the density of myelinated fibers, looked preserved in Plp null mice compared to WT mice, whatever the age tested (Figure 7). With smaller magnification, sciatic nerve sections showed well preserved nerve architecture in both genotypes at both ages, with no fiber loss or increased endoneurial space due to edema and reduced myelin width (data not shown).

One observation made in 3-month-old mice but more striking in 15-month-old mice, is that Plp null mice exhibited axons with less regular circular shape than WT mice did. Axon's perimeters of Plp null mice seemed less defined than in WT mice with more convolutions.

Electron micrographs of sciatic nerve revealed that myelinated and unmyelinated Schwann cells were observed, in both WT and Plp null mice, with the same density. Myelin thickness and axonal organization seemed to be preserved in Plp null mice and there were no obvious signs of degeneration

and macrophage infiltration (Figure 7). In older mice from both genotypes some axonal swelling and large whorls of myelin membrane which are often associated with a degenerating axons or Schwann cells were sometimes observed (data not shown).

Neuropathological analyses were also performed in cervical spinal cord and revealed dysmyelination and axonal degeneration only in 15-month-old Plp null mice. As these abnormalities have already been widely described by other and ourselves (Griffiths et al., 1998b; Garbern et al., 2002; Hassen et al., 2009), they are not illustrated in this article.

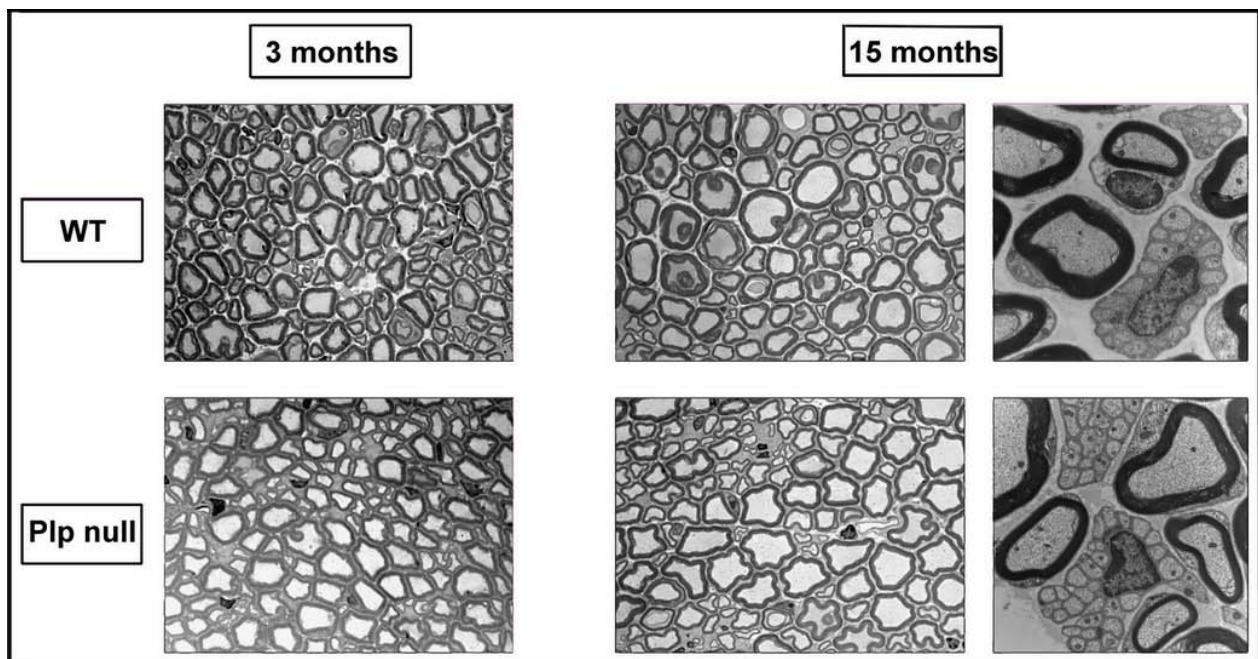


Figure 7. Section of the sciatic nerve wild-type (WT) and Plp null mice aged of 3 and 15 months.

Semithin toluidine blue-stained cross section of the sciatic nerve WT and Plp null mice aged of 3 and 15 months. 700 nanometers thick epoxy embedded sciatic nerve section from WT and Plp null mice stained with toluidine blue were photographed using x100 length. Myelin thickness and axon's organization seem to be preserved in Plp null mice compared to WT mice.

Electron micrographs from the sciatic nerve of WT and Plp null mice aged of 15 months. 70 nanometers thick epoxy embedded sciatic nerve section from WT and Plp null mice stained with uranyl acetate and lead citrate were photographed using x12000 magnification. Myelinated and unmyelinated Schwann cells are observed in both WT and Plp null mice with the same frequency. Myelin thickness and axon's organization seem to be preserved. In older mice from both genotypes some axonal swelling and large whorls of myelin membrane which are often associated with a degenerating axons or Schwann cells are sometimes observed.

3.5. Immunohistochemical study

3.5.1. Decrease in myelin amount in Plp null mice

Having established that behavioral and electrophysiological sensory processes were significantly affected in Plp null mice, we next examined cellular mechanisms that may underlie these changes. First, we measured the expression of MBP, one main marker of myelination, in the spinal dorsal horn of 3- and 15-month-old Plp null mice. While there was no difference between both genotypes in percentage of MBP staining in 3-month-old mice ($p > 0.05$, Student-*t*-test) (Figure 8A and 8C), mice with deletion of *Plp1* gene at 15 months of age exhibited a great significant decrease in MBP staining compared to WT mice ($p < 0.0001$, Student-*t*-test), reflecting a dysmyelinated state (Figure 8B and 8C).

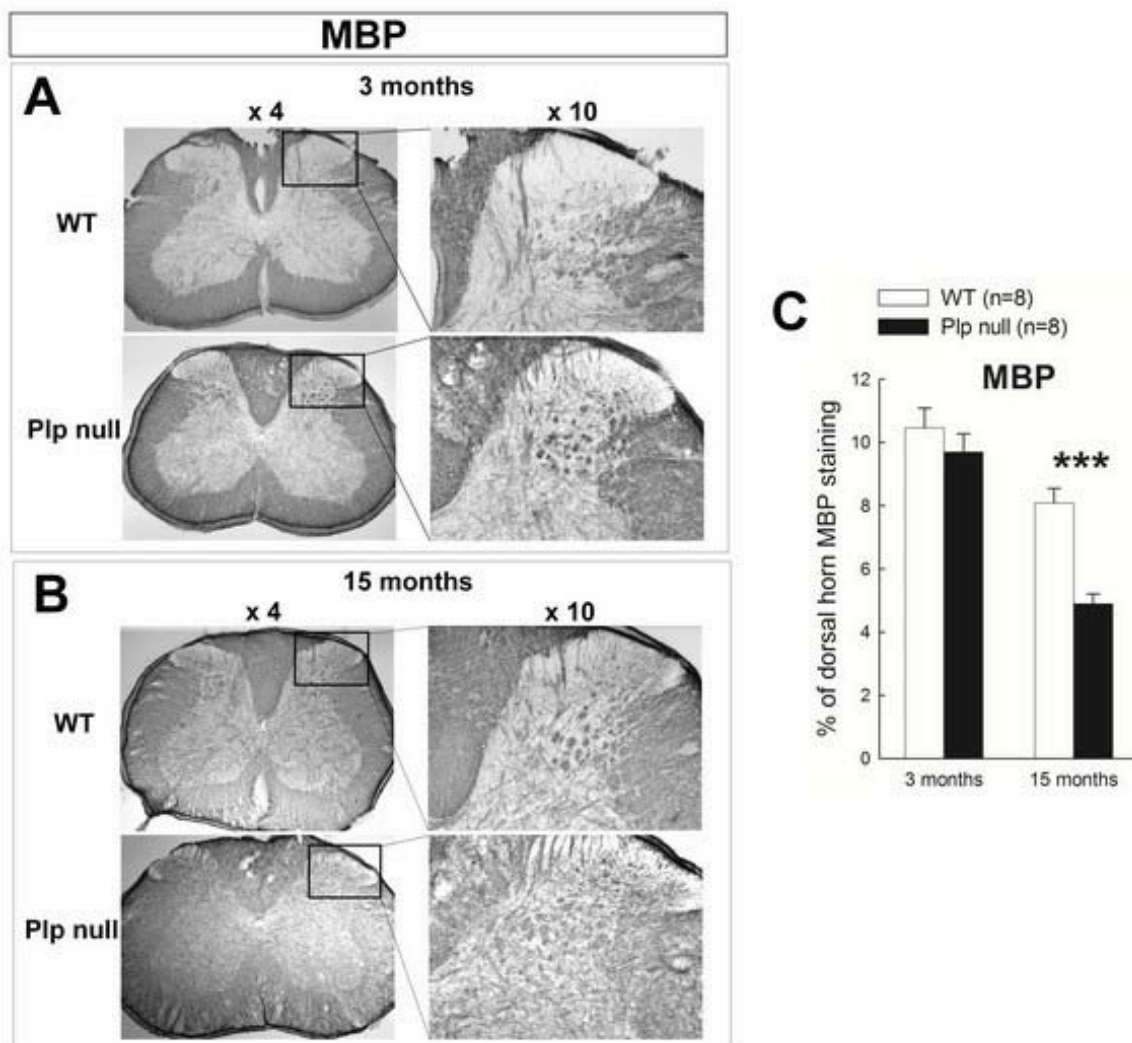


Figure 8. Expression of myelin basic protein (MBP) in spinal dorsal horn of 3- and 15-month-old Plp null and wild-type (WT) mice.

Pictures show examples of MBP expression in dorsal horn of WT and Plp null mice at x4 and x10 magnifications, in 3-month-old (A) and 15-month-old mice (B). Graphic shows the quantification of MBP dorsal horn staining at 3 and 15 months (C). Plp null mice exhibit a significant decrease in MBP expression compared to WT mice only at 15 months of age.

Results are expressed as mean value \pm SEM (***) $p < 0.001$, Student-*t*-test)

3.5.2. Astrocyte and microglial proliferation in the spinal dorsal horn of Plp null mice

The first response to demyelination is an activation of microglia (Jack et al., 2005, 2005) and astrocytes (Nair et al., 2008) and numerous studies have demonstrated their influence on pain sensitivity in a variety of injury models (DeLeo and Yeziarski, 2001; Scholz and Woolf, 2007). Therefore, we examined astrocyte proliferation with GFAP immunostaining, as well as microglial reactivity with Iba1 immunostaining in the spinal dorsal horn of 3- and 15-month-old Plp null and WT mice.

The staining density of GFAP in the spinal dorsal horn was significantly enhanced in Plp null compared to WT mice at both 3 and 15 months of age ($p=0.005$ and $p<0.0001$ respectively, Student-*t*-test) (Figure 9A-C).

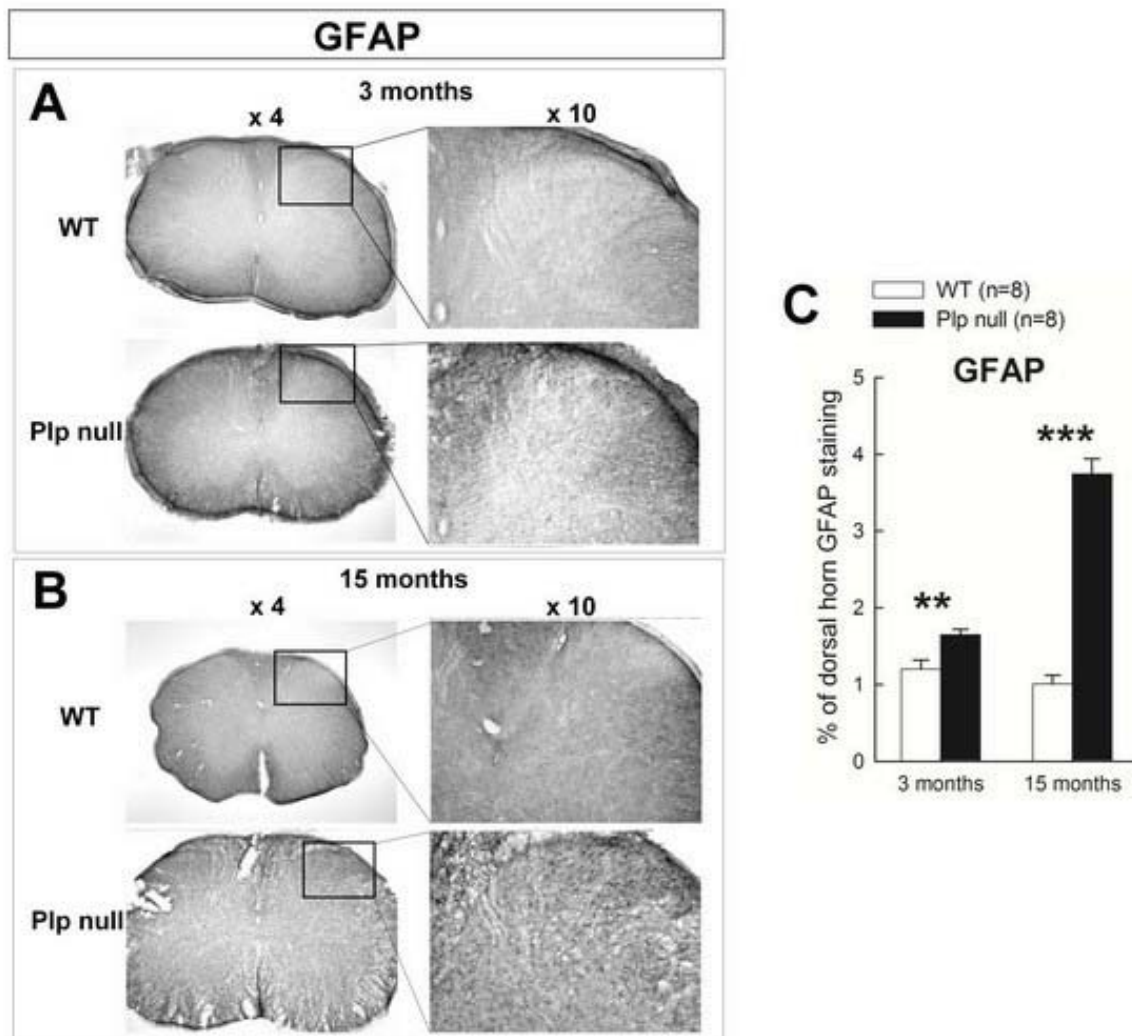


Figure 9. Astrocyte reactivity in spinal dorsal horn of 3- and 15-month-old Plp null and wild-type (WT) mice.

Pictures show examples of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in the dorsal horn of WT and Plp null mice at x4 and x10 magnifications, at 3 months (A) and 15 months (B). Graphic shows the quantification of GFAP dorsal horn staining at 3 months and 15 months of age (C). Plp null mice exhibit a great significant increase in GFAP expression compared to WT mice at both ages.

Results are expressed as mean value \pm SEM (** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Student-*t*-test).

Analysis of microglial reactivity showed that the Iba1 staining density was also significantly enhanced in Plp null mice compared to WT mice at 3 and 15 months in the spinal dorsal horn ($p=0.0007$ and $p=0.002$, respectively, Student-*t*-test) (Figure 10A-C). These findings suggest that an astrocyte and microglial proliferation in the spinal dorsal horn, similar to that of injury models, is observed in Plp null mice.

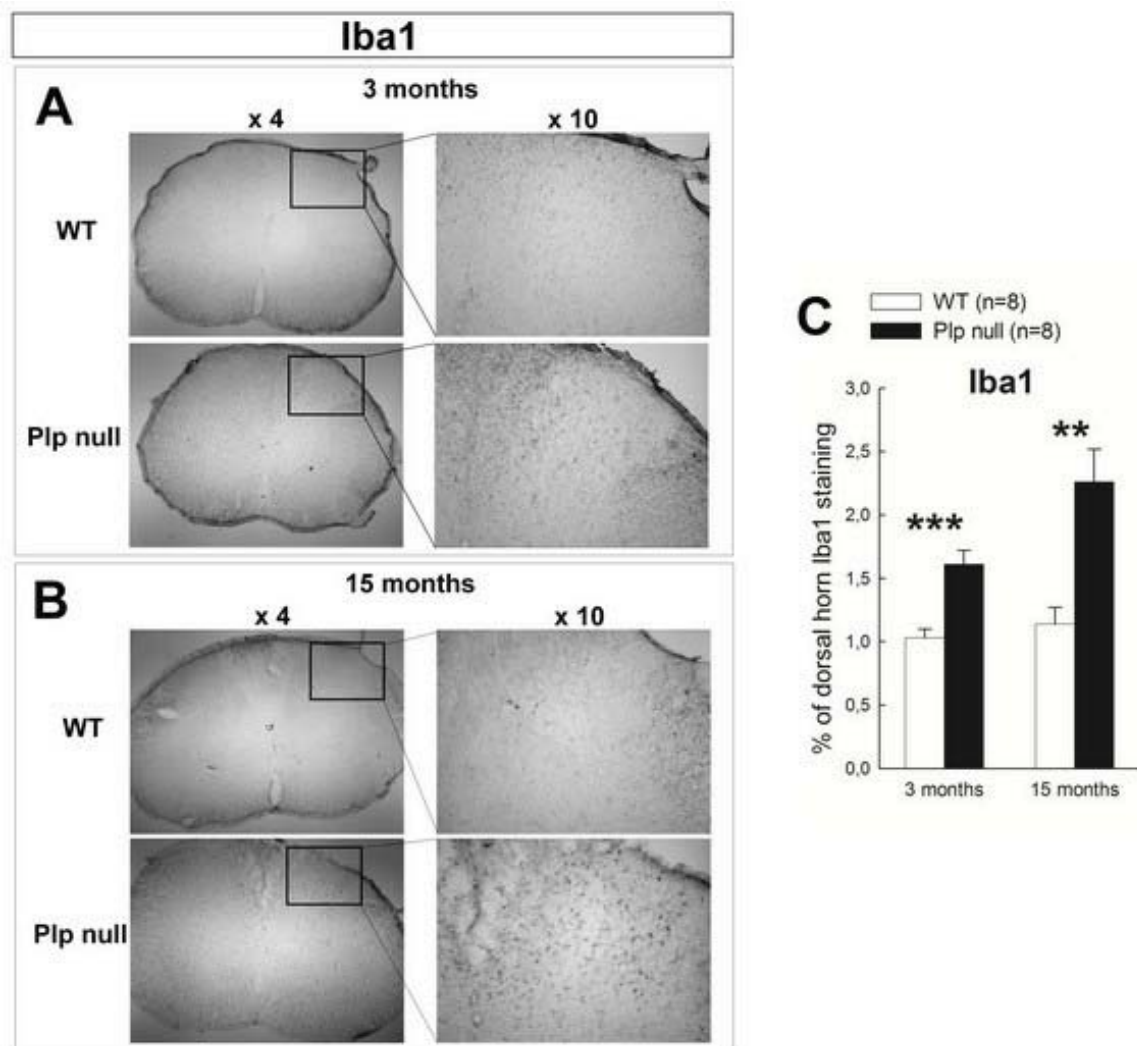


Figure 10. Microglial proliferation in spinal dorsal horn of 3- and 15-month-old Plp null and wild-type (WT) mice.

Pictures show examples of ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) expression in the dorsal horn of WT and Plp null mice at x4 and x10 magnifications, at 3 months (A) and 15 months (B). Graphic shows the quantification of Iba1 dorsal horn staining at 3 months and 15 months of age (C). Plp null mice exhibit a significant increase in Iba1 expression compared to WT mice at both ages.

Results are expressed as mean value \pm SEM (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student-*t*-test).

3.5.3. Sensory neuropeptides up-regulation in Plp null mice spinal dorsal horn

To identify potential differences in total amount of neurons in the dorsal horn of Plp null and WT mice at 3 months and 15 months of age, we performed a staining of a neuron-specific nuclear protein, NeuN.

No statistical difference in percentage of NeuN dorsal horn staining between genotypes at 3 or 15 months was observed ($p>0.05$, Student-*t*-test) (Figure 11A-C). In contrast the evaluation of total number of dorsal horn neurons revealed that 15-month-old Plp null mice exhibit less neurons than WT mice ($p=0.03$, Student-*t*-test), while no difference was observed between genotypes in 3-month-old mice ($p>0.05$, Student-*t*-test) (Figure 11D).

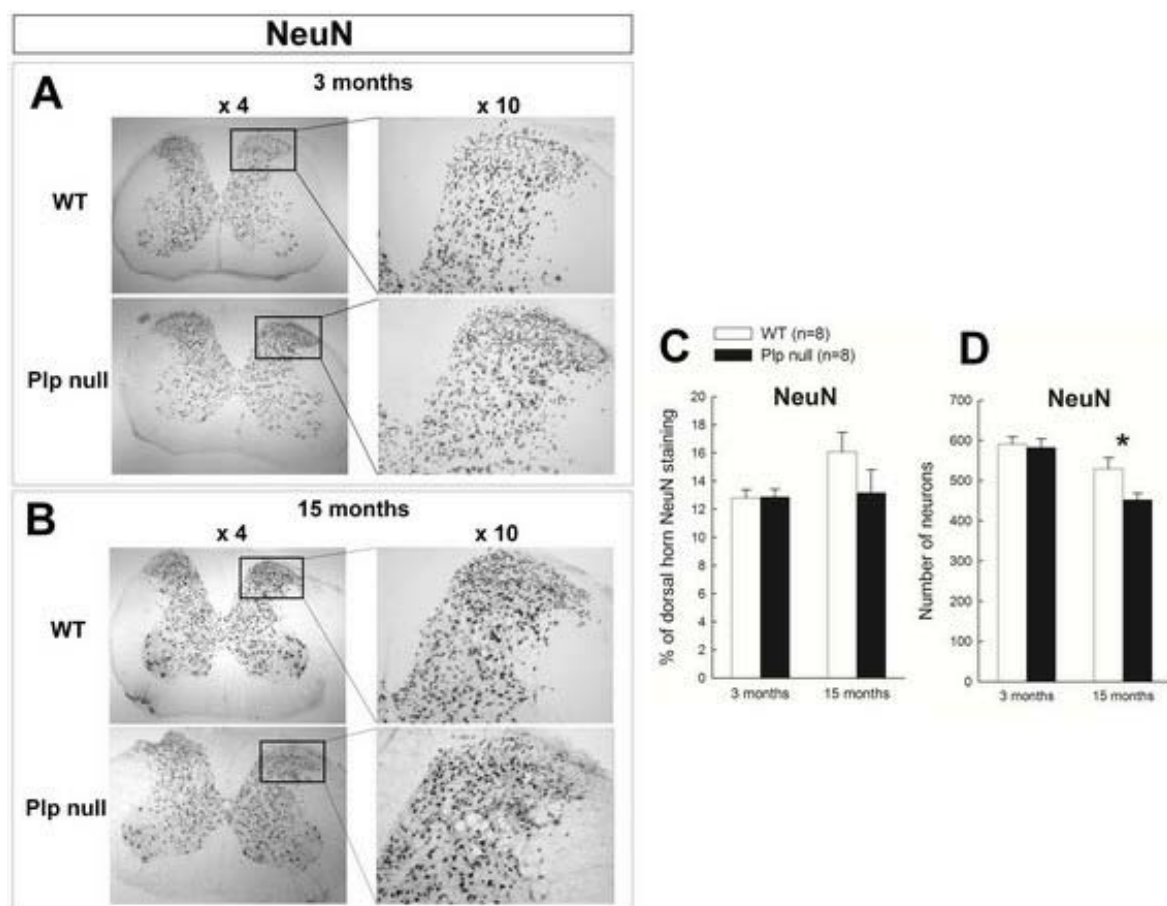


Figure 11. Expression of the neuron-specific nuclear protein, NeuN, in the spinal dorsal horn of 3- and 15-month-old Plp null and wild-type (WT) mice.

Pictures show examples of NeuN expression in the dorsal horn of WT and Plp null mice at x4 and x10 magnifications at 3 months (A) and 15 months (B). Graphics show the quantification of percentage of NeuN dorsal horn staining at both ages (C) and the total number of dorsal horn neurons of Plp null and WT mice at both ages (D). Plp null mice exhibit fewer neurons than WT mice at 15 months.

Results are expressed as mean value \pm SEM (* $p < 0.05$, Student-*t*-test).

The expression pattern of some sensory neuropeptides, like CGRP and galanin, is up-regulated in the dorsal horn of neuropathic pain models (Liu and Hökfelt, 2002; Yu et al., 2009). Thus, we also examined the expression of these two neuropeptides in the spinal dorsal horn of Plp null mice at both ages. The staining density of CGRP is significantly up-regulated in the dorsal horn of Plp null mice compared to

WT mice at 15 months ($p=0.01$, Student-*t*-test) (Figure 12B and 12C), while there is no difference between genotypes at 3 months ($p>0.05$, Student-*t*-test) (Figure 12A and 12C). Although, a slight increase of the galanin expression is observed in Plp null mice dorsal horn at both 3 and 15 months of age (Figure 13A-C), this up-regulation is not statistically significant ($p=0.11$ and $p=0.07$, respectively, Student-*t*-test).

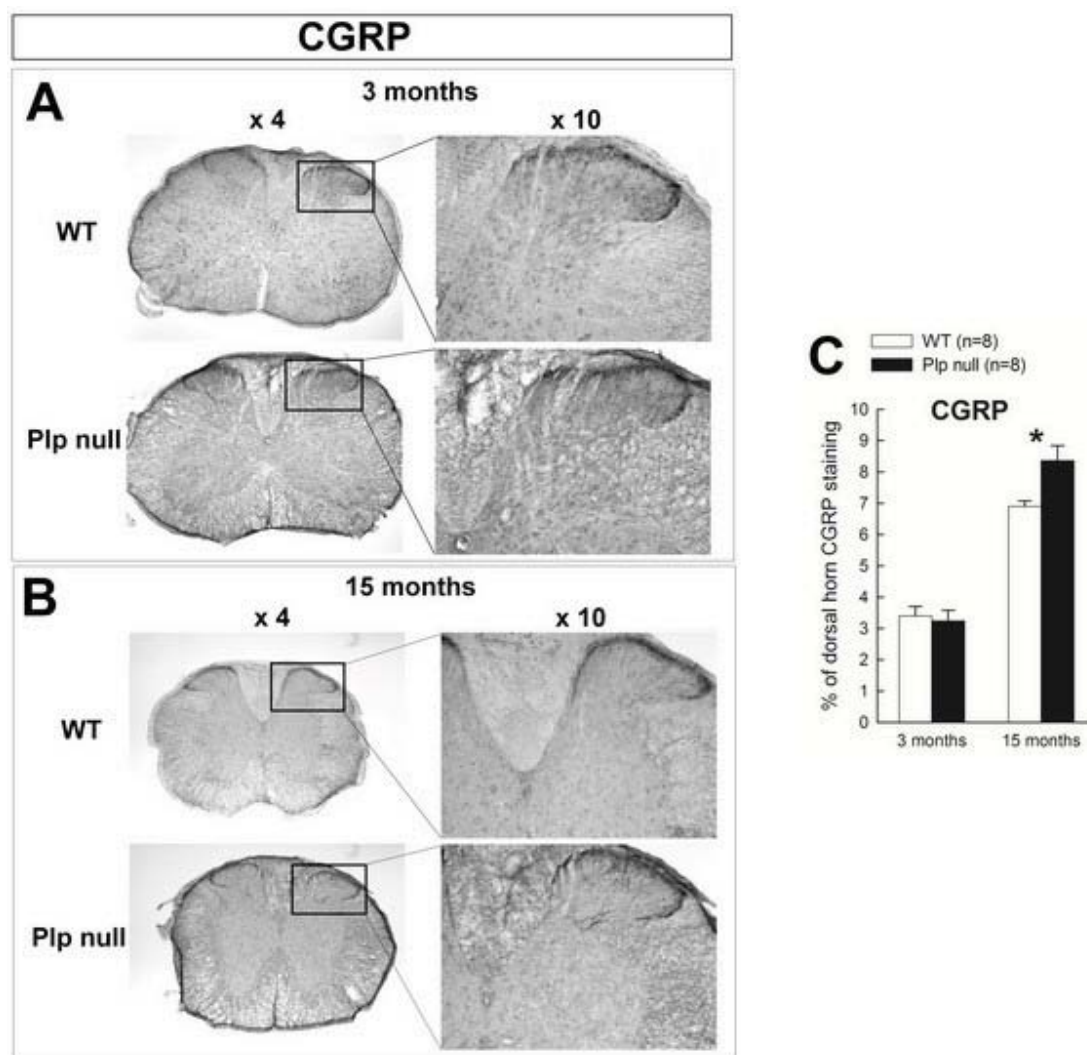


Figure 12. Expression of the sensory neuropeptide, calcitonine gene-related peptide (CGRP), in the spinal dorsal horn of 3- and 15-month-old Plp null and wild-type (WT) mice.

Pictures show examples of CGRP expression in the dorsal horn of WT and Plp null mice at x4 and x10 magnifications at 3 months (A) and 15 months (B). Graphic shows the quantification of percentage of CGRP dorsal horn staining at both 3 and 15 months of age (C). Plp null mice exhibit a significant increase in CGRP expression.

Results are expressed as mean value \pm SEM (* $p < 0.05$, Student-*t*-test).

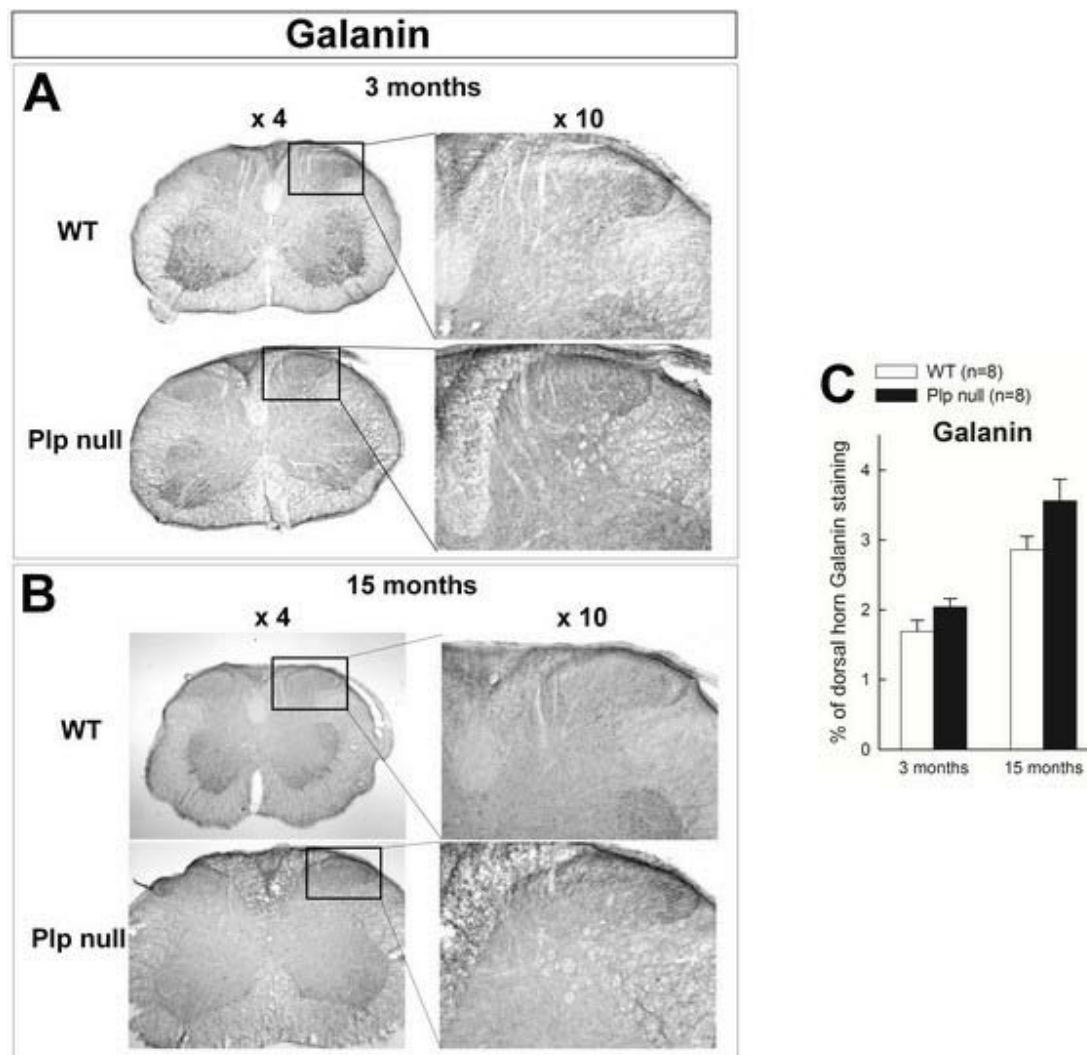


Figure 13. Expression of the sensory neuropeptide, galanin, in the spinal dorsal horn of 3- and 15-month-old Plp null and wild-type (WT) mice.

Pictures show example of galanin expression in the dorsal horn of WT and Plp null mice at x4 and x10 magnifications at 3 months (A) and 15 months of age (B). Graphic shows the quantification of percentage of galanin dorsal horn staining at both 3 months and 15 months of age (C). There is no difference between genotypes in galanin expression even if there is a tendency to increase in Plp null mice at both ages.

Results are expressed as mean value \pm SEM.

4. Discussion

This study shows for the first time that Plp null mice exhibit an early onset severe thermal hyperalgesia that is not associated to change in thermal allodynic behavior. Electrophysiological testing showed a decrease in peripheral and spinal conduction velocity associated with electro-neuro-myographic abnormalities. Morphological analysis of sciatic nerve and spinal cord showed that, peripheral nerve fibers organization is preserved even in old mice, while the lack of PLP is known to be associated to axonal degeneration and myelin abnormalities in the CNS. Finally, immunohistochemical analysis of the spinal cord dorsal horn revealed an early onset astroglial proliferation worsening with age leading to perturbation of sensory neuropeptides expression. Taken together, these results strongly suggest that Plp nul mice suffer from ganglionopathy, associated with central demyelination but few peripheral nerve alterations, probably induced by glial mediated spinal cord sensitization.

Plp null mice exhibit thermal early appearing thermal hyperalgesia

The CNS neuropathological abnormalities have been carefully described in Plp null mice showing subtle myelin defects observed only in mice older than 3 months (Klugmann et al., 1997; Jurevics et al., 2003; Rosenbluth et al., 2006) associated with a progressive axonopathy (Griffiths et al., 1998b; Hassen et al., 2009) related to altered axonal transport (Edgar et al., 2004). Conversely, until recently, the behavioral presentation of these mice was limited to the description of rotarod dysfunction in old mice (Griffiths et al., 1998b, 1998b). In this study, we described for the first time early abnormal behaviors in response to somatosensory stimuli in Plp null mice. We found that these mice exhibit thermal hyperalgesia in the tail-flick test as soon as 3 months of age without modification to heat allodynia. These results strongly suggest that Plp null mice are hypersensitive only to painful stimuli, however, evaluation of mechanical allodynia should be realized before to conclude definitively.

Plp null mice exhibit electrophysiological abnormalities distinct from those observed in peripheral neuropathies

In order to assess the mechanisms of changes in behavioral reaction to somatosensory stimuli we performed electrophysiological measures of motor and sensory nerves and central spinal conduction. Our results showed that Plp null mice exhibit a decrease in conduction velocity observed in the central but also in the peripheral nervous system associated with ENMG abnormalities affecting both the motor and the somatosensory conduction.

Schaumburg et al., in a very meticulous study, showed that stimulation at the distal part of the caudal nerves allows the activation of sensory axons, mediating pain and thermal sensitivity that are almost

exclusively unmyelinated or thinly myelinated (Schaumburg et al., 2010). We used this site of stimulation because it allow an accurate distance measurement between the stimulation and the recording site and represents an ideal protocol for correlating of electrophysiological data with behavioral measures of nociception and thermal sensitivity, such as tail flick. Our results for the caudal nerve velocity then showed that Plp null mice develop with age a slowing of the sensory conduction.

The Hoffman reflex (H-reflex) is the electrical analogue of the tendon jerk reflex, which is mediated through monosynaptic pathways in the spinal cord (Hosoido et al., 2009). ENMG recorded during the H-reflex typically shows two responses: an initial M-wave elicited by direct activation of motor axons and a later H-wave elicited by the synaptic activation of motoneurons by Group Ia muscle afferents through the spinal reflex pathway. In this study we showed that Plp null mice exhibited an increase in the latency for the M wave whatever the age tested and for the H-wave only at 15 months. Regarding the amplitudes of the M- and the H-waves, there was no difference between genotype, whatever the age tested. Under normal conditions, the magnitude of the H wave is attenuated by repetitive activation. This attenuation has been thought to reflect presynaptic mechanisms mediated through descending inhibitory pathways (Hosoido et al., 2009); or a depletion of neurotransmitters at the synapse between Ia afferents and spinal motoneurons, a phenomenon known as post activation depression (Palmieri et al., 2004). We observed no modification in the H-wave amplitude attenuation induced by high frequency stimulation in young or old Plp null mice. Finally, we also performed a threshold protocol showing that Plp null mice elicit electrophysiological activity for the same intensity of stimulation than WT mice.

To evaluate the spinal SEP, we used the protocol described by Chandran et al., in 1994 with only minor modification: the place of the stimulation which was realized at the base of the tail and not to the tibial nerve (Chandran et al., 1994). We choose this location in order to reproduce a condition close to that eliciting the tail flick reflex. Because of this change in stimulation protocol we found only the NI and NII waves but with an interpeak interval (0.60 ± 0.03 ms in 3-month-old WT mice) very close to that described by Chandran et al., (0.67 ± 0.04 ms in 12-week-old mice), thus validating our protocol. We showed in Plp null mice increased latencies for NI (only in old mice) and NII peaks. NI, the first component of spinal SEP, is most probably due to conduction in large diameter myelinated muscle afferents, while the NII is probably elicited by conduction along fibers with lesser conduction velocity notably large diameter cutaneous afferents.

In summary the absence of a clear decrease in waves amplitudes and poly-phasic CMAPs suggest that there is no axonal loss in Plp null mice (Zielasek and Toyka, 1999). Furthermore, peripheral and central conduction were slow down suggesting that both peripheral and central axons of dorsal root ganglion cells are affected as observed in human ganglionopathies.

Plp null mice show no major sciatic nerve abnormalities and spinal cord dysmyelination and axonal defects are observed only in old mice

We then assessed whether the functional alterations detected with neurophysiological studies were confirmed by the presence of evident morphological changes at the peripheral and central nervous system. Very strikingly, the morphological analysis of sciatic nerve reveals no major abnormalities sustaining these peripheral electrophysiological dysfunctions, except for the profiles of the myelinated axons which tend to be rather polygonal in cross section compared with the smooth rounded curvature of WT myelin. If in CNS and especially the spinal cord the previously described dysmyelination associated with axonal degeneration could have explained the electrophysiological defect observed in old animals, this is not the case in younger ones showing no obvious morphological abnormalities. Taking together, our results suggest that in both peripheral and central nervous system, electrophysiological dysfunctions might precede neuropathological abnormalities. In fact, it has already been reported that electrophysiological responses can be altered by non-structural or very subtle structural changes that are below the resolution of even the most sophisticated histopathological procedures. Arezzo et al., proposed that these alterations may be linked to 1) ion channel composition and distribution along the axon, 2) dysfunction of motoneuron rather than the loss of motoneuron cell bodies, 3) dysfunction of axonal trafficking (Arezzo et al., 2011). Interestingly, change in the shape of the axons to a less circular profile has been related to a decrease in neurofilament and microtubules expression (Solomon and Zurn, 1981; Parhad et al., 1995) which could have implication in our electrophysiological data.

Spinal cord dorsal horn histological data suggest a central neuropathy in Plp null mice

The decrease in tail flick reflex latency that we observed in Plp null mice can result from 1) an increase in sensory or motor nerve conduction velocities, 2) a decrease in the activation threshold for noxious stimuli, 3) an alteration of the somatosensory input processing at the spinal level. Because our electrophysiological results clearly invalidated the two first hypotheses, we then focused our attention on the spinal cord dorsal horn, as the site of integration of the somatosensory information. We performed an immunohistochemistry analysis and identified in Plp null mice dorsal horn a significant proliferation in astrocyte and microglial reactivity at 3 months of age which seriously worsened with age. At 15 months of age, this astrogliosis is associated with an up-regulation in the sensory neuropeptide CGRP expression, going with a decrease in total number of neurons without a decrease in the surface of NeuN staining. First, these results suggest that in old Plp null mice the number of neurons is reduced but that

the remaining ones may adopt a swollen morphology. Second, it seems that some of neurons may modify their protein expression and switch to neurons expressing CGRP instead of the generation of new CGRP neurons.

Inflammatory processes and reactive gliosis, have already been described as contributing to neuropathic pain behaviors in numerous models (Tsuda et al., 2005; Olechowski et al., 2009; Hulsebosch et al., 2009) and recent interest in pain research has emphasized the important contribution of immune and glial cells in chronic pain (Watkins and Maier, 2002; Marchand et al., 2005; Moalem and Tracey, 2006). Reactive glial cells can modulate spinal excitability and mediate pain hypersensitivity through production and release of cytokines and growth factors such as brain-derived neurotrophic factor which are able to sensitize nociceptive neurons (DeLeo and Yeziarski, 2001; Coull et al., 2005). Similar to the neuropathic pain that arises as result of peripheral nerve lesions, sensitization of spinal pain pathways and the consequent behavioral hypersensitivities in Plp null mice may also be triggered by increased activity in these non-neuronal cells in the superficial dorsal horn.

Enhanced expression of CGRP in the dorsal horn axons has already been identified as implied in pain-related behavioral responses in the CNS (Yu et al., 2009). Anatomically, there are two broad groups of sensory fibers: myelinated A fibers and smaller diameter unmyelinated C fibers. CGRP, with substance P and the high-affinity nerve growth factor neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 (TrKA), is expressed in the 10% of unmyelinated fibers. The majority of C fibers are polymodal nociceptors that respond to all forms of noxious stimulation (thermal, mechanical and chemical) and terminate superficially within the dorsal horn (Hunt and Mantyh, 2001). Therefore, central sensitization induced by glial cells may in a second step be emphasized by a neuronal sensitization implying the CGRP expression.

Because Plp null mice recapitulate many features observed in SPG2 and MS patients, abnormal integration of sensory information at the spinal cord level could sustain pain complain in these diseases

First behavioral abnormalities observed in Plp null mice are also the main symptoms of SPG2 and MS patients, where motor dysfunctions are the main clinical signs and are often associated with sensitive complains (MS: Michalski et al., 2011; Solaro and Uccelli, 2011; SPG2: Cailloux et al., 2000; Inoue, 2005; Boespflug-Tanguy O, Personal data). Second, neuropathological defects combine CNS demyelination, axonal defects and reactive gliosis (MS: Reynolds et al., 2011; SPG2: Garbern et al., 2002; Sima et al., 2009). Finally, both central and peripheral electrophysiological abnormalities have been observed in these diseases as in Plp null mice (MS: Gartzen et al., 2011; SPG2: Garbern et al.,

1997, 1999). Thereby, as Plp null mice mimic many characteristics of both SPG2 and MS diseases, it is possible, that the abnormal processing of sensory information at the spinal cord level we have described in this study, could sustain pain complains in both diseases.

One possible explanation to unify the decrease in peripheral and central conduction velocity with the histological findings in spinal cord is the assumption proposed by Klaus Nave, that hypomyelination and reduced conduction velocity in long axons limit the distance over which neurons can fire in synchrony, perturb synaptic plasticity and then degrade signal integration (Nave, 2010). While this assumption was developed to explain the cognitive defects observed in white matter disease, our results suggest its validity for sensitive behaviors.

5. Conclusion

Plp null mice represent a good model for human pathology and for a therapeutic approach somatosensory dysfunction in SPG2 patients because of the similitude in the changes of behavioral responses to somatosensory stimuli. Moreover, as patients with SPG2 exhibit important motor defects it is really difficult to investigate precisely their sensitive characteristics while the late onset of motor dysfunction in our mouse model makes a longitudinal analysis possible. It appeared that changes of behavioral responses to somatosensory stimuli due to lack of PLP reflect changes in glial but also in neuronal cells in the spinal dorsal horn and is associated with conduction velocity defects at peripheral and central level.

6. Acknowledgements

Melina Begou was supported as fellow researcher by the Neurodis Foundation for completion of this study. Bérengère DEPIETS was supported as PhD students by the Regional Council of Auvergne and the European Regional Development Fund; these two organizations have also funded the videotracking system and the Neuropack μ MEB-9100 recording device.

We thank the personals of the center of health cellular imaging (CICS) of Auvergne universities for their technical assistance concerning the histological study and Said Gandhour, Aurora Pujol and Homa Adle-Biassette for the very interesting discussions concerning the brain morphology.

References

- Arezzo JC, Litwak MS, Zotova EG (2011) Correlation and dissociation of electrophysiology and histopathology in the assessment of toxic neuropathy. *Toxicol Pathol* 39:46–51.
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81:871–927.
- Cailloux F, Gauthier-Barichard F, Mimault C, Isabelle V, Courtois V, Giraud G, Dastugue B, Boespflug-Tanguy O (2000) Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease. *Eur J Hum Genet* 8:837–845.
- Chandran AP, Oda K, Shibasaki H, Pisharodi M (1994) Spinal somatosensory evoked potentials in mice and their developmental changes. *Brain Dev* 16:44–51.
- Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017–1021.
- DeLeo JA, Yezierski RP (2001) The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain* 90:1–6.
- Duncan ID, Kondo Y, Zhang S-C (2011) The myelin mutants as models to study myelin repair in the leukodystrophies. *Neurotherapeutics* 8:607–624.
- Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang S-C, Fowler JH, Montague P, Barrie JA, McCulloch MC, Duncan ID, Garbern J, Nave KA, Griffiths IR (2004) Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 166:121–131.
- Garbern JY et al. (1997) Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin. *Neuron* 19:205–218.
- Garbern JY, Cambi F, Lewis R, Shy M, Sima A, Kraft G, Vallat JM, Bosch EP, Hodes ME, Dlouhy S, Raskind W, Bird T, Macklin W, Kamholz J (1999) Peripheral neuropathy caused by proteolipid protein gene mutations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 883:351–365.
- Garbern JY, Yool DA, Moore GJ, Wilds IB, Faulk MW, Klugmann M, Nave K-A, Sistermans EA, van der Knaap MS, Bird TD, Shy ME, Kamholz JA, Griffiths IR (2002) Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain* 125:551–561.
- Gartzen K, Katzarava Z, Diener H-C, Putzki N (2011) Peripheral nervous system involvement in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 18:789–791.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Thomson C, Vouyiouklis D, Nave KA (1998a) Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microsc Res Tech* 41:344–358.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA (1998b) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280:1610–1613.
- Gruenenfelder FI, Thomson G, Penderis J, Edgar JM (2011) Axon-glial interaction in the CNS: what we have learned from mouse models of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Anat* 219:33–43.
- Hassen WB, Bégou M, Traore A, Moussa AB, Boehm N, Ghandour MS, Renou J-P, Boespflug-Tanguy O, Bonny J-M (2009) Characterisation of spinal cord in a mouse model of spastic paraplegia related to abnormal axono-myelin interactions by in vivo quantitative MRI. *Neuroimage* 46:1–9.
- Ho SM, Waite PME (2002) Effects of different anesthetics on the paired-pulse depression of the h reflex in adult rat. *Exp Neurol* 177:494–502.
- Hosoido T, Motoyama S, Goto M, Mori F, Tajima T, Hirata H, Wada N (2009) Characteristics of H- and M-waves recorded from rat forelimbs. *Neurosci Lett* 450:239–241.
- Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, Carlton SM (2009) Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *Brain Res Rev* 60:202–213.
- Hunt SP, Mantyh PW (2001) The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2:83–91.
- Inoue K (2005) PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* 6:1–16.
- Jack C, Ruffini F, Bar Or A, Antel JP (2005) Microglia and multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Research* 81:363–373.

- Jurevics H, Hostettler J, Sammond DW, Nave K-A, Toews AD, Morell P (2003) Normal metabolism but different physical properties of myelin from mice deficient in proteolipid protein. *J Neurosci Res* 71:826–834.
- Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA (1997) Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18:59–70.
- Liu H-X, Hökfelt T (2002) The participation of galanin in pain processing at the spinal level. *Trends in Pharmacological Sciences* 23:468–474.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005) Role of the Immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6:521–532.
- Michalski D, Liebig S, Thomae E, Hinz A, Bergh FT (2011) Pain in patients with multiple sclerosis: a complex assessment including quantitative and qualitative measurements provides for a disease-related biopsychosocial pain model. *J Pain Res* 4:219–225.
- Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Research Reviews* 51:240–264.
- Nair A, Frederick TJ, Miller SD (2008) Astrocytes in multiple sclerosis: A product of their environment. *Cell Mol Life Sci* 65:2702–2720.
- Nave K-A (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468:244–252.
- Noël J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, Guy N, Borsotto M, Reeh P, Eschalièr A, Lazdunski M (2009) The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 28:1308–1318.
- Olechowski CJ, Truong JJ, Kerr BJ (2009) Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* 141:156–164.
- Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA (2004) The hoffmann reflex: methodologic considerations and applications for use in sports medicine and athletic training research. *J Athl Train* 39:268–277.
- Parhad IM, Scott JN, Cellars LA, Bains JS, Krekoski CA, Clark AW (1995) Axonal atrophy in aging is associated with a decline in neurofilament gene expression. *J Neurosci Res* 41:355–366.
- Reynolds R, Roncaroli F, Nicholas R, Radotra B, Gveric D, Howell O (2011) The neuropathological basis of clinical progression in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 122:155–170.
- Rosenbluth J, Nave K, Mierzwa A, Schiff R (2006) Subtle myelin defects in PLP null mice. *Glia* 54:172–182.
- Schaumburg HH, Zotova E, Raine CS, Tar M, Arezzo J (2010) The rat caudal nerves: a model for experimental neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* 15:128–139.
- Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10:1361–1368.
- Shimizu I, Iida T, Guan Y, Zhao C, Raja SN, Jarvis MF, Cockayne DA, Caterina MJ (2005) Enhanced thermal avoidance in mice lacking the ATP receptor P2X₃. *Pain* 116:96–108.
- Sima AAF, Pierson CR, Woltjer RL, Hobson GM, Golden JA, Kupsky WJ, Schauer GM, Bird TD, Skoff RP, Garbern JY (2009) Neuronal loss in Pelizaeus–Merzbacher disease differs in various mutations of the proteolipid protein 1. *Acta Neuropathologica* 118:531–539.
- Solaro C, Uccelli MM (2011) Management of pain in multiple sclerosis: a pharmacological approach. *Nat Rev Neurol* 7:519–527.
- Solomon F, Zurn A (1981) The cytoskeleton and specification of neuronal morphology. *Neurosci Res Program Bull* 19:100–124.
- Tsuda M, Inoue K, Salter MW (2005) Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in [']small' glia. *Trends in Neurosciences* 28:101–107.
- Watkins LR, Maier SF (2002) Beyond Neurons: Evidence That Immune and Glial Cells Contribute to Pathological Pain States. *Physiological Reviews* 82:981–1011.
- Yu L-C, Hou J-F, Fu F-H, Zhang Y-X (2009) Roles of calcitonin gene-related peptide and its receptors in pain-related behavioral responses in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 33:1185–1191.
- Zielasek J, Toyka KV (1999) Nerve conduction abnormalities and neuromyotonia in genetically engineered mouse models of human hereditary neuropathies. *Ann N Y Acad Sci* 883:310–320.

Article 2

"Motor but also cognitive defects in mice deleted for
the major myelin protein"

Article 2. “Motor but also cognitive defects in mice deleted for the major myelin protein”

I. Présentation et méthodologie

Les patients atteints de PMD/SPG2 présentent d'importants déficits moteurs qui constituent une difficulté inhérente dans la caractérisation et la quantification d'éventuelles anomalies cognitives. Cependant, des patients atteints de dysfonctionnements cognitifs ont déjà été décrits, notamment plusieurs patients SPG2 ont développé en plus de déficits moteurs, des troubles d'anxiété/hyperactivité (Hodes et al., 1997), ou encore des déficits cognitifs et d'attention (Hobson et al., 2002).

Grâce à l'utilisation des souris transgéniques invalidées pour le gène *Plp1* (Plp null) (Klugmann et al., 1997) qui présentent des similitudes avec les patients SPG2, comme une dégénérescence axonale des voies spinales marquée par des gonflements axonaux des fibres de petit calibre (Griffiths et al., 1998b; Garbern et al., 2002), on peut envisager une meilleure compréhension des troubles liés à PLP. Alors que les anomalies neuropathologiques, notamment un défaut de compaction de la myéline et une détérioration axonale (Rosenbluth et al., 2006; Hassen et al., 2009), ont été bien décrites chez ces souris, les études comportementales restent très rares et concernent seulement l'exploration des performances motrices au rotarod, montrant un apparent défaut de coordination motrice d'apparition tardive (Griffiths et al., 1998b). Afin de caractériser les anomalies cognitives et comportementales liées à l'absence de PLP, nous avons réalisé une étude longitudinale sur les souris Plp null et comparé leur phénotype avec ceux observés chez l'homme. D'un point de vue pratique, les motifs d'expression ainsi que l'évolution temporelle des comportements moteurs et cognitifs ont été étudiés chez les souris de l'âge de 3 mois à 15 mois, en les soumettant à divers tests moteurs (rotarod, open-field, grip test) et cognitifs (labyrinthe en Y, test de reconnaissance d'objets, test de sociabilité et reconnaissance sociale, labyrinthe en croix surélevé, test d'enfouissement de bille de verre). Les potentiels évoqués auditifs ont également été évalués pour déterminer les vitesses de conduction nerveuses et constituer un index de la fonction axonale et de la myélinisation. Enfin, des analyses immunohistologiques et de l'expression de gènes impliqués dans diverses voies biologiques ont été réalisées sur les cerveaux des souris Plp null afin d'identifier les substrats cellulaires des anomalies comportementales identifiées.

II. Résultats et discussion

L'étude des anomalies cognitives et comportementales des souris Plp null nous a permis de mettre en évidence des déficits moteurs associés à des altérations de la mémoire de travail et un dysfonctionnement du comportement anxieux. Les analyses électrophysiologiques ont montré que ces anomalies comportementales étaient associées à une apparente diminution de la vitesse de conduction centrale. Tandis que les défauts d'organisation axonale déjà décrits sont probablement responsables des troubles moteurs, nous avons montré que des anomalies cellulaires hippocampiques et/ou corticales pourraient être la cause des troubles cognitifs observés.

Jusqu'à aujourd'hui, les analyses comportementales des souris Plp null étaient restreintes à l'évaluation du comportement moteur au rotarod. Dans la première description des souris Plp null, elles ne présentaient pas d'altérations motrices aux âges de 6 et 12 mois (Klugmann et al., 1997). Les études suivantes ont décrit une diminution des performances au rotarod chez des souris âgées de 12 mois (Yin et al., 2006) et 16 mois (Griffiths et al., 1998b). Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence d'altérations motrices chez les souris Plp null entre 3 et 15 mois, cependant des évaluations sur des animaux plus âgés (données non présentées) ont révélé des anomalies seulement à 18 et 21 mois. Ces contradictions dans la littérature et notre étude peuvent s'expliquer par les différences de protocoles utilisés et selon la base de données Eumorphia, le rotarod reste un test dont les résultats sont difficiles à homogénéiser à cause du fort impact environnemental, notamment les facteurs stressant l'animal.

Les analyses approfondies du profil moteur des souris Plp null ont permis d'identifier une fatigue musculaire sévère et précoce dès 3 mois qui s'aggrave avec l'âge. Ces données sont en accord avec l'apparition précoce d'une dégénérescence des voies axonales longues. Nous avons également mis en évidence une forte augmentation de l'activité locomotrice des souris Plp null dès 9 mois s'aggravant avec l'âge. Cette augmentation de l'activité locomotrice ne semble pas être liée à une meilleure fonction musculaire, si on prend en compte les autres résultats de l'évaluation motrice, mais peut probablement être liée à des troubles cognitifs. Cette hypothèse est appuyée par l'augmentation du temps passé dans les zones anxiogènes de certains tests, révélant une anomalie du comportement anxieux chez les souris Plp null. Les résultats d'autres tests axés sur l'anxiété nous ont suggéré une potentielle diminution de l'intérêt des souris Plp null pour leur environnement, mais tous confirment clairement un comportement anxieux dérégulé.

Enfin l'évaluation des différents aspects de la fonction mnésique a révélé un déficit de la mémoire de travail chez les souris Plp null s'aggravant avec l'âge, tandis que la mémoire épisodique à court terme et à long terme n'est pas affectée.

Les analyses des potentiels évoqués auditifs des souris Plp null ont permis d'identifier une augmentation des latences des différentes ondes à 9 mois et une disparition des ondes III et IV à 15 mois. Ces résultats confirment une démyélinisation menant à des anomalies de conduction des voies nerveuses auditives et sont cohérents avec des données de patients SPG2 (Svenstrup et al., 2010).

Les études de biologie moléculaire sur les cerveaux des souris Plp null à 15 jours, 3 mois et 15 mois, grâce à deux technologies distinctes, les plaques pré-façonnées SABiosciences (voir Annexe 1) et la technologie Taqman, ont permis d'identifier des anomalies d'expression de gènes impliqués dans les processus de neurogenèse, des neurotrophines et leur récepteurs ou encore des récepteurs de neurotransmetteurs et leurs régulateurs. La confirmation avec les sondes Taqman des résultats SABiosciences n'a cependant pas été concluante pour certains gènes. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces défauts de reproductibilité (1) il existe une différence technique entre ces deux technologies qui pourraient alors présenter des différences de sensibilité (Sybr green vs. sonde fluorescente), (2) l'étude SABiosciences a été réalisée avec des pools d'ADNc (n=2), tandis que l'étude Taqman a été réalisée pour chaque échantillon d'ADNc (n=8), ce qui peut augmenter l'impact de variations inter-individuelles, (3) entre les 2 études, la pondération statistique des résultats par génotype et par âge est très différente avec 4 données dans l'étude SABiosciences dues à la réalisation de pools, contre 32 données dans l'étude Taqman,.

Enfin, les analyses immunohistologiques (marquages NeuN, GFAP, calbindine et parvalbumine) sur les cerveaux des souris Plp null âgées de 15 mois, ont révélé des anomalies d'expression de certains marqueurs dans des zones de l'hippocampe, notamment une diminution de GFAP dans la région CA3 et la couche cellulaire interne du gyrus denté, et une diminution de la calbindine seulement dans la région CA3. Il est vraisemblable que les anomalies d'expression de ces protéines dans ces régions cérébrales sous-tendent les troubles cognitifs observés chez les souris Plp null.

La protéine PLP est particulièrement impliquée dans la stabilité de la myéline. La composition biochimique de la myéline est quasiment identique chez l'Homme et la souris, et il est peu probable que *PLP1*, étant particulièrement conservée dans l'évolution, serve différentes fonctions dans les diverses espèces mammifères. Une hypothèse a été émise selon laquelle l'absence de *PLP1* chez l'humain ou la souris pourrait permettre la formation d'une gaine de myéline a priori normale dans les stades précoces du développement (dans les premières années de vie chez l'homme et quelques semaines chez la souris). Cependant avec l'âge, il se produirait une détérioration de cette myéline instable menant à une atteinte

neurologique progressive (Boison et Stoffel, 1994; Klugmann et al., 1997; Griffiths et al., 1998b). L'évolution clinique des patients atteints et des souris transgéniques est cohérente avec cette hypothèse. En dépit de la rareté des PLP-pathies, les mutations de *PLP1* chez l'Homme et l'animal, ont générées un énorme intérêt pour la compréhension des processus de myélinisation et de la réparation de la myéline. La mise en évidence de troubles cognitifs chez les souris Plp null permet également de les proposer comme un modèle d'étude du lien entre SB et fonction cognitive.

III. Conclusion et perspectives

L'analyse comportementale des souris Plp null a donc permis de mettre en évidence, en plus des anomalies motrices, d'importantes altérations cognitives chez ces souris. Grâce aux investigations électrophysiologiques, histologiques et moléculaires, nous avons pu identifier de nombreux marqueurs pouvant présenter un rôle dans ces dysfonctionnements cognitifs. Ce travail n'est cependant pas complètement terminé. Concernant l'étude histologique, nous prévoyons d'approfondir l'étude en évaluant le profil d'autres protéines au niveau de l'hippocampe. Nous envisageons tout d'abord de terminer l'étude des membres de la famille EF des protéines liant le calcium, en s'intéressant à la calrétinine. Nous devons également étudier la qualité de la myéline au niveau de l'hippocampe en réalisant un marquage MBP et en quantifiant le nombre d'OLs grâce à un marquage CC1. Enfin, nous nous intéresserons à la qualité des axones en réalisant un marquage APP, qui présente des accumulations en cas de troubles du transport axonal. Il serait également intéressant, lorsque les anticorps spécifiques sont disponibles, de valider au niveau protéique, les marqueurs identifiés au niveau des transcrits. Enfin, si nous avons commencé l'étude par l'investigation de l'hippocampe qui nous paraissait être la structure la plus intéressante aux vues des troubles comportementaux observés, d'autres structures pourraient également être pertinentes comme l'amygdale ou le CPF.

IV. Article

Motor but also cognitive defects in mice deleted for the major myelin protein

DEPIETS Bérengère^{1,4}, GIRAUDET Fabrice², AVAN Paul², VAURS-BARRIERE Catherine^{1,5}, BECHON Céline^{1,4}, GONTHIER-GUERET Céline^{1,4}, BOESFLUG-TANGUY Odile^{3,4}, BEGOU Mélina^{1,4}

¹ University of Clermont-Ferrand, Medical faculty, Clermont-Ferrand, France

² Neuro-Dol, INSERM U1107, University of Clermont-Ferrand, Medical faculty, department of biophysic, France

³ CHU Robert Debré, reference center for "leukodystrophies", Paris, France

⁴ INSERM U676, Hôpital Robert Debré, Paris, France

⁵ GReD, INSERM U1103, University of Clermont-Ferrand, Medical faculty, France

Abstract

Deletion or truncating mutation in the proteolipoprotein 1 gene (*PLP1*) cause a mild form of X-linked dysmyelinating disorders, the type 2 spastic paraplegia (SPG2). While motor signs with ataxia and spasticity are the classical manifestations, cognitive disturbances have been reported but are not well characterized. Mice with deletion of the PLP gene (Plp null mice) have been developed to model the human disease.

To further investigate the cognitive and behavioral abnormalities related to PLP null expression, we initiated a longitudinal study in Plp null mice on motor and cognitive behaviors. Auditory brainstem responses were measured to assess nerve conduction within the early auditory system and constitute an index of axonal function and myelination *in vivo*. We then performed a gene expression assay and an immunohistological analysis on Plp null brain to identify cellular substrates of the identified behavioral abnormalities.

We report that Plp null mice exhibit motor dysfunction which progressively deteriorate with age. These mice also exhibit working memory impairment and anxiety disturbance. The gene expression assay reveals (1) important modifications of mRNA involved in the neurogenesis in 15-days-old Plp null mice; (2) modifications in some neurotransmitter systems. The immunohistological study shows a decrease in GFAP and calbindin expression in some hippocampus areas.

We have identified a link between PLP deletion and the presence of cognitive defects in human that are recapitulated in our mouse model. Furthermore we showed that axonal degeneration and progressive demyelination could be associated with the development of such cognitive behaviors. Given the growing interest in determining the white matter implication in cognitive function, our data unveil a new model for further understanding this implication.

I. Introduction

The proteolipoprotein 1 gene (*PLP1*), located on the X-chromosome, undergoes alternative splicing to produce either fulllength PLP or the shorter DM20 isoform which are the two major constitutive protein of the central nervous system (CNS) myelin. Deletion or truncating mutation in the *PLP1* gene lead to a mild forms of X-linked dysmyelinating disorders, the type 2 spastic paraplegia (SPG2). In SPG2 (MIM 312920), the motor milestones of the first year of life is not impaired but the affected boys develop progressive gait abnormalities in the 5 following years. The slow progression of ataxia leads to severe spasticity and loss of ambulation over about 10 years are associated with learning disabilities. A progressive multifocal, predominantly axonal, peripheral neuropathy is sometimes associated (Garbern et al., 1999). While the motor and cerebellar manifestations have been carefully studied, the cognitive deficits associated with *PLP1* gene mutations have received significantly less attention. An inherent difficulty in characterizing and quantifying cognitive defects in PMD-SPG2 patients originates from limitations imposed by motor deficits. However, patients with predominantly cognitive dysfunctions have been described. Multiple members of a single family with a nucleotide mutation in exon 3B resulting in a stop codon manifested mild motor deficits, but a prominent anxiety/hyperactive disorder (Hodes et al., 1997). Identically, in a family with a deletion of 19 base pairs in intron 3, the affected males manifested predominantly attention and cognitive deficits and mild motor and coordination deficits (Hobson et al., 2002).

A number of spontaneous and genetically engineered mouse mutants carrying mutations in the *Plp1* gene have been described in the last decades and the neuropathological studies of these mice have largely contributed to our understanding of PLP-related disorders. The genetically modified mice in which the *Plp1* gene is inactivated (*Plp* null mice) (Klugmann et al., 1997) have similarly to SPG2 patients an age- and length-dependent degeneration of long spinal tracts with axonal swellings of small-diameter axons (Griffiths et al., 1998; Garbern et al., 2002). After an initial description of rather normal-looking CNS myelin sheaths with only intraperiod lines abnormalities (Klugmann et al., 1997), others subtle myelin defects have been subsequently reported in older *Plp* null mice (Rosenbluth et al., 2006). The abnormalities found in the compaction as well in the normal alignment of the radial component of the spinal cord and optic nerve myelin seem to participate to the axon damage (Rosenbluth et al., 2006). More recently, abnormal myelin compaction and axonal defects has been confirmed *in vivo* using diffusion tensor imaging (Hassen et al., 2009). While the neuropathological abnormalities have been extensively described in these mice, behavioral studies are very poor and concern only rotarod performance, showing late onset appearance of coordination defects (Griffiths et al., 1998; Yin et al., 2006).

To further investigate the cognitive and behavioral abnormalities related to PLP null expression, we initiated a longitudinal study in Plp null mice. The pattern and temporal evolution of motor and cognitive behaviors have been assessed. Auditory brainstem responses (ABR) were measured to assess nerve conduction within the early auditory system and constitute an index of axonal function and myelination *in vivo*. The gene expression assay on 15-month-old Plp null mice brain showed modifications in genes involved in the neurogenesis and in some neurotransmitter systems. The immunohistological investigation shows a decrease in GFAP and calbindin expression levels in localized hippocampus areas.

II. Material and methods

1. Animals

Plp null mice (PlpY^{-/-}) and their wild-type (WT) littermates were generated as previously described (Klugmann et al., 1997). These mice are a kind gift from Klaus NAVE (Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen Germany). Genotyping was performed as previously described (Klugmann et al., 1997). Mice were housed eight per cage in a temperature (22°C) controlled environment under a 12:12 light/dark cycle (light from 7:00 AM. to 7:00 PM.), with ad libitum access to food (Harlan pellets, Harlan Gannat, France) and water. All tests took place during the light phase of the nycthemeral cycle between 9:00 and 12:00 AM for the rotarod, grip strength and the open-field tests, between 14:00 and 18:00 PM for Y maze, EPM, marble burying and object recognition and sociability and social recognition tests..

In electrophysiological analysis, PLP null mice and their corresponding WT mice have been tested at 6, 9 and 15 months. A complete group of age was composed of 8 mice of each genotype. For technical reason, mice tested in electrophysiology differed from those used in behavioral studies. In behavioral studies, PLP null mice and their corresponding WT mice have been tested at 3, 6, 9, 12 and 15 months. A complete group of age was composed of 18 mice of each genotype.

Experiments were performed in accordance with French and European Economic Community guidelines for the care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering (86/09/EEC–Council Directive of 24 November 1986).

2. Motor behaviors

- *Open field*

The spontaneous locomotor activity of mice was evaluated in a white polyvinyl chloride open field apparatus (50 cm long x 50 cm wide x 50 cm high) where the tested mice can move freely. Virtual

areas, a central square and a peripheral corridor, were determined with video-tracking software (Viewpoint, Lyon, France). During 15 minutes, total distance traveled, time spent and distance traveled in each area of the field were recorded with the video tracking system. Results are expressed as the total distance traveled and the percentage of distance travelled in central area calculated as distance travelled in central area / total distance travelled in the entire field.

- *Rotarod*

Motor coordination was determined using a standard mouse rotarod (TSE, Hombourg Germany), which provided an accelerating rotational speed. We used the standard operating procedures described by the EUMORPHIA group program (www.eumorphia.org) including training and a test phases; (Mandillo et al., 2008). *Training phase*: Mice initially underwent a training session on the apparatus, for three consecutive trials, when the rod was maintained at constant speed. The rod was kept stationary for the first trial and held at 4 rotations per minutes (rpm) for the last two trials. Inter-trial intervals (ITI) were 10 minutes. Mice which were able to stay on the rod at 4 rpm for 60 seconds, were put through the testing phase, with at least 30 minutes interval between the last training trial and the test phase. *Test phase*: Four trials were completed, with a 15 minutes-ITI. In each trial (T1–T4), mice were placed on the rod rotating at 4 rpm after which the timer was started and the rod accelerated from 4 to 40 rpm for 300 seconds.

The latency to fall off the rod was determined automatically by a timer that measured to the nearest tenth of a second; however, the timer was manually stopped if a mouse held onto the rod completing a full rotation (i.e. “passive rotation”).

- *Grip test*

A grip strength meter (Bioseb, Chaville, France) was used to assess hind- or hind- and fore-paws grip strength. Mice were lifted and held by their tail so that their paws could grasp a wire grid. The mice were then gently pulled backward by the tail with their posture parallel to the surface of the table until they released the grid. The grip strength meter digitally displays the maximum force applied as the peaks tension (in newton) once the grasp is released. Each mouse performed five consecutive trials, first with forepaws and then with hind- and fore-paws. The mean value was taken as an index of paws grip strength.

3. Auditory brainstem responses (ABR)

Electrophysiological testings were performed under standard conditions in a sound attenuated and electrically shielded recording chamber. Recording were performed under levels of general anaesthesia with ketamine chlorhydrate and chlorobutanol (Imalgene®, Merial, Lyon, France) and diazepam (Valium

®, Roche, Basel, Switzerland) (1 mL/kg of a solution containing 11.25 mg Imalgene® and 0.375 mg of diazepam; intraperitoneally). This very well tolerated mixture is ideal for anesthesia of short duration and allows a fast and sure awakening. It would be thus possible to carry out a longitudinal follow-up on the same animal (at ages 6 months, 9 months and 15 months). During testing, animal body temperature was regulated and maintained stable at 37.5°C with a heating pad (Homeothermic blanket system, Phymep – France).

Subdermal needle electrodes were placed at vertex (positive electrode), behind the infra-auricular mastoid region (reference electrode for each test ear) and in the neck region (ground electrode). A total of 300 trials were averaged for each waveform and two waveforms were obtained for each stimulus condition. The stimulus presentation, ABR acquisition, equipment control and data management were coordinated using the Nihon Koden device (Neuropack μ). Alternating click stimuli (100 μ s duration, bandpass filter 100-3000Hz, rate 17/s) were delivered via insert earphone (Etymotic Research ER3). Auditory thresholds were obtained for each ear by reducing the stimulus intensity at 10dB steps (beginning with a maximum of 90dB) and finally at 5dB steps up and down to identify the lowest level of which an ABR could be recognized.

The absolute latencies of waves I-IV (at 90 dB stimulus intensity) of ABR was evaluated and the data were expressed as a mean \pm S.E.M for each animal group.

4. Cognitive behaviors

- *Y-maze*

The Y-maze assesses the natural tendency of rodent to explore a new environment and to establish a strategy of alternation using working memory. Spontaneous alternation behaviour and exploratory activity were recorded in a Y maze. The apparatus was made of three equal arms (40 cm long x 10 cm wide x 16 cm high) made of black polyvinyl chloride. The starting arm and the two arms forming the Y were radiating at an angle of 120° from each other. Without prior habituation to the apparatus, each mouse was placed at the end of one arm, facing the end wall of the arm, and allowed to move freely through the maze during a 10-minutes session. The initial arm was alternated within the group of mice to prevent bias of arm placement. Latency to leave the first arm and total number and sequence of entries into each arm were scored for each mouse. An arm entry was counted when the mouse had all four paws inside the arm. Mice that completed less than eight arm entries within 10 minutes were excluded from further analysis. Y-maze performance was calculated by methods described in current literature. A spontaneous alternation was defined as entries into all three arms on three consecutive choices. The alternation score (%) for each mouse was defined as the ratio of the actual number of

alternations to the total possible number of alternations over the testing period: $\% \text{ Alternation} = 100 \times [(\text{Number of alternations}) / (\text{Total arm entries} - 2)]$ and represent an index of working memory. Total entries were scored as an index of locomotor activity and the latency to exit the starting arm as emotionality-related behaviour.

- *Object recognition test*

The object recognition test allows to assess the episodic memory of mice, at short term with an ITI of 10 minutes or at long term with an ITI of 60 minutes. The test was set of 2 trials. During the first trial, T1, the mouse was placed in a white polyvinyl chloride cage (36 cm long \times 14 cm wide \times 21 cm high) filled of sawdust and was subjected to 2 identical objects placed at the 2 opposite sides of the cage. The session was stopped after 20 seconds of object exploration. A cut-off time was fixed at 5 minutes and mice that did not reached this criterion were excluded of study. Between T1 and T2, the mouse was removed in the home cage for an ITI of 10 minutes or 60 minutes. In the second trial T2, one object was changed by a new object and during 5 minutes the exploration time of each object was measured, allowing to define a percentage of recognition (exploration time of new object / total exploration time of both objects).

- *Sociability and social recognition*

The sociability and social recognition test allows, first, to define the level of sociability of mice and, second, to evaluate a component of memory, the preference for social novelty. The test was set of 3 sessions. Between each session the mouse was removed in the home cage for 5 minutes. In the habituation session, the mouse was placed in the middle of a white polyvinyl chloride open-field (50 cm long \times 50 cm wide \times 50 cm high) containing 2 empty wire cups (an inverted stainless steel wire pencil cup; Galaxy, Kitchen Plus, <http://www.kitchen-plus.com>) on both sides. A heavy cup was placed on the top of each inverted wire pencil cup to prevent the subject from climbing on top or moving it. The mouse was allowed to freely explore for 5 minutes. Exploration times and movements of the mice were recorded using a video tracking system (Viewpoint, Lyon, France) that allowed to define virtual zones in the field; circles around each cup for exploration times and rectangle areas for time spent in each part of the field (Fig.1). In the T1 session (length 5 minutes), an unfamiliar adult WT female mouse was placed in one of the wire cups. This session allows the evaluation of the sociability index (exploration time of unfamiliar mice – exploration time of empty cup / total exploration time of both cups). In T2 session (length 5 minutes), while the first intruder is still posted in his wire cup, another unfamiliar adult mouse was placed in the second cups. The time spent to explore the new intruder compared to total exploration time defines the percentage of social recognition.

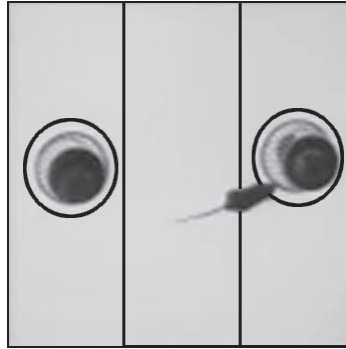


Figure 1. Sociability and social recognition test setup. The tested mouse is currently exploring the intruder mouse confined in the wire cup. Black lines represent the virtual zones defined with the video-tracking software and used to determine exploration times (black circles) and movements (black rectangles) of mice in the field.

- *Elevated plus maze*

The elevated plus maze (EPM) assesses the natural conflict between the tendency of mice to explore a novel environment and the tendency to avoid a brightly lit, elevated, open area (Rodgers and Dalvi, 1997). The EPM comprised two open arms and two closed arms (37 cm long x 6 cm wide) that extended from a central platform (6 cm x 6 cm). The apparatus was constructed from Plexiglas (black floor and walls) and elevated at 50 cm above floor level. The mouse was placed on the central platform, facing one of the enclosed arms, and was allowed to explore the maze for 10 minutes. The distance traveled, the number of open and closed arm entries and the time spent in different parts of the maze (open and closed arms, central platform) were recorded with a video tracking system (Viewpoint, Lyon, France). Results are expressed as the total as the number of arm entries and the percentage of time spent in the open arms.

- *Marble burying test*

The procedure for marble burying was adapted with minor modifications from previously described (Millan et al., 2001). Mice were individually placed in polyvinyl chloride cages (dimensions 36 cm long x 21 cm x 14 cm) containing a 4-cm layer of sawdust and 20 glass marbles (diameter 1.6 cm) evenly spaced over the cage (five rows of four marbles). Mice freely explore the cage during 30 minutes. The number of marbles buried more than two thirds in the sawdust was scored at 30 minutes.

5. qRT-PCR analysis

Right brains of 8 Plp null mice and 8 WT mice, at each age (15 days, 3 months and 15 months) were sampled. Total ARN were extracted (RNeasy Lipid Tissue Kit, Qiagen, Germantown, USA), and treated with DNase (Invitrogen Kit, Paisley, UK) to exclude the presence of contaminating DNA. Each sample was quantified by spectrometric measure at 260nm (Nanodrop 1000, ThermoScientific, Waltham, USA).

- *SABiosciences predesigned plates*

For analysis with SABiosciences predesigned plates, ARN from 4 mice with the same genotype were pooled before reverse transcription (RT). A 20µL-reaction solution was performed by mixing 0.5µg of ARN, RT 1X reaction buffer, 4mM of dNTP, 1X RT random primers, RNase inhibitors and 50U of Multiscribe™ Reverse Transcriptase (High capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Carlsbad, USA). RT was performed in following conditions: 10 minutes at 25°C, 120 minutes at 37°C, 5 minutes at 85°C (Thermocycler 2720, Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Then, RT products were diluted at 1/20; each was divided in two samples and stored at -20°C.

qRT-PCR was performed on the eight samples obtained after RT (2 samples for each initial pool of ADNc). qRT-PCR was performed using SABiosciences™ chips technology on predesigned plates (RT² Profiler™ PCR ARRAY plates, SABiosciences, Qiagen, Germantown, USA). Three plates of 84 genes with distinct profiles were tested: a plate with a “Neurogenesis” profile (PCR Array Catalog #PAMM-404A), a plate “Neurotrophins and receptors” (PCR Array Catalog #PAMM-031A) and a plate “Receptors of neurotransmitters and regulators” (PCR Array Catalog #PAMM-060A). PCR was performed by filing, in each well, 25µL from a mix containing 102µL of products from RT reaction, 1350µL of 2X SABiosciences RT² qPCR Master Mix and 1248µL of water. PCR was performed in following conditions: 10 minutes at 95°C, 40 cycles of 15 seconds at 95°C (denaturing phase) and 1 minute at 60°C (primers hybridization phase) (7300 Real Time PCR system, Applied Biosystems). Quantification of emitted fluorescence was made during the last phase of each cycle. Profiles of each gene were analyzed by calculations comparing Ct (cycle thresholds) that is the number of cycles from which the amount of emitted fluorescence exceeds a defined basic threshold. To compare data, each plate contains endogenous control genes, Actb (beta actin) and Gapdh (Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase). Results were interpreted with the ΔCt method that allows to calculate an expression ratio between genes of interest and control genes ($\Delta C_{t_{\text{gene of interest}}} = C_{t_{\text{gene of interest}}} - C_{t_{\text{Actb/Gapdh}}}$). Then final expression of results was normalized by using the transformation $2^{(-\Delta Ct)}$.

- *Taqman gene expression assays*

According to results obtained with the SABiosciences analysis, 13 genes were selected because of their potential interest in cognitive function. Probes corresponding were obtained from Applied Biosystems. We selected 5 genes from the “neurogenesis” plate: *Bai1* (brain-specific angiogenesis inhibitor 1, Mm00558144_m1), *Cdk5rap2* (CDK5 regulatory subunit associated protein 2, Mm00524401_m1), *ErbB2* (V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog, Mm00658541_m1), *S100a6* (S100 calcium binding protein A6, calcyclin, Mm00771682_g1) and *Shh* (Sonic hedgehog, Mm00436528_m1); 2 genes from the “Neurotrophins

and receptors" plate: *Il6* (interleukin 6, Mm00446190_m1) and *Il6ra* (Interleukin 6 receptor alpha, Mm00439653_m1); 6 genes from the "Receptors of neurotransmitters and regulators" plate: *Chma1* (cholinergic receptor nicotinic alpha polypeptide 1, Mm00431627_m1), *Chma7* (cholinergic receptor nicotinic alpha polypeptide 7, Mm01312230_m1), *Gabrb2* (GABA A receptor subunit beta 2, Mm00433467_m1), *Gabbr2* (GABA C receptor subunit rho 2, Mm00433507_m1), *Gira4* (Glycine receptor alpha 4 subunit, Mm00501674_m1) and *Nmur1* (neuromedin U receptor 1, Mm00515885_m1). We added for analysis, markers of oligodendrocytes development *Olig2* (Oligodendrocyte lineage transcription factor 2, Mm01210556_m1) and *Mbp* (Myelin basic protein, Mm00521979_m1), marker of neuronal development, *Nestin* (Mm00450205_m1), and astrocytic development, *Gfap* (Glial fibrillary acidic protein, Mm00546086_m1).

For analysis with Taqman technology, ARN of mice with the same genotype were not pooled, but RT was performed in the same conditions than described previously. PCR analysis was performed in 96-wells plates by filing, in each well, 4 µL of products from RT reaction 1/20 dilution and 16µL from a mix containing 1040µL of Master Mix, 104µL of Gapdh, 416µL of water, 104µL of probe of interest. PCR was performed in following conditions: 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, 40 cycles of 15 seconds at 95°C (denaturing phase) and 1 minute at 60°C (primers hybridization phase) (7300 Real Time PCR system, Applied Biosystems). To allow detection of endogenous control gene and gene of interest in the same well, we used gapdh tagged with VIC and gene of interest tagged with FAM. Results were interpreted with the ΔC_t method that allows to calculate an expression ratio between genes of interest and control genes ($\Delta C_{t_{\text{gene of interest}}} = C_{t_{\text{gene of interest}}} - C_{t_{\text{gapdh}}}$). For a more visual representation, data were reported to WT: $\Delta \Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{gene of interest}}} - \text{mean of } \Delta C_{t_{\text{WT}}}$. Then final expression of results was normalized by using the transformation $2e^{-\Delta \Delta C_t}$.

6. Immunohistological analysis

Eight 15-month-old Plp null and WT mice were anesthetized with pentobarbital and sacrificed by transcardiac perfusion with 4% PFA freshly prepared in 0.1M PBS. The brain was entirely removed and included in 6% agarose. 20 µm slices were realised with a Vibratome HM 650V (Microm, Francheville, France). Immunohistochemistry was performed on histological sections. Cell distribution was evaluated using the following primary antibodies: rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP at 1:4000, Millipore, Temecula, USA), mouse anti-neuronal nuclei (NeuN at 1:1000, Millipore, Temecula, USA), rabbit anti-calbindin D-28K (CB at 1:2000, Millipore, Temecula, USA) and mouse anti-parvalbumin (PV at 1:2000, Millipore, Temecula, USA). Primary antibodies were incubated at 4°C overnight. Following 3 consecutive 15 minutes washes in PBS triton 0.3%, sections were incubated in dedicated biotinylated

secondary antibodies (1:5000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) for 2h at room temperature. After washing, the sections were processed for 1h using a standard Vectastain ABC kit (Vector laboratories, Burlingame, USA). Staining was visualized with diaminobenzidine (DAB, Vector laboratories, Burlingame, USA) as a chromatic agent. Control slices were incubated as described above, without primary or secondary antibodies. No immunoreactivity was seen in controls (data not shown).

Histological sections were examined using optic microscope BX51 (Olympus, Southend-on-Sea, UK) at magnification x10 and x4. Digital images were captured with CCD digital camera (Roper Scientific GmbH, Ottobrunn, Germany) using Metamorph version 6.2 software (Roper Scientific GmbH, Ottobrunn, Germany). All images analysis and quantifications were performed on pictures using ImageJ software (ImageJ 1.44, National Institutes of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Hippocampus was manually delimited and 3 different areas were defined: one area representative of the superficial cellular layer of the dentate gyrus (area I.1), one area representative of the intern cellular layer of the dentate gyrus (area I.2) and one area representative of Ammon's horn, CA3 (area II). Positive pixels of these regions of interest were determined using the "threshold" tool of the software. The total number of positive pixels was reported to the total number of pixels for each slice and averaged per animal. This percentage of immunoreactive area is presented as mean \pm standard error of the mean.

7. Statistical analysis

Statistical analysis has been performed using the Statview software (SAS institute Inc, Cary, NC).

In the behavioral analysis, quantitative data were analyzed separately for each test by factorial two-way ANOVA, with genotype and age as main factors. Post-hoc PLSD Fisher comparisons were used to assess differences between genotype within each age.

In electrophysiological analysis, quantitative data were analyzed by repeated two-way ANOVA, with genotype and age as main factors and the latency of waves evoked response as the repeated measures. Post-hoc PLSD Fisher comparisons were used to assess differences between genotype within each age. In SABiosciences quantitative RT-PCR analysis, data were analyzed by the non-parametric Mann-Whitney test. In Taqman quantitative RT-PCR analysis and immunohistological analysis, data were analyzed by Student t-test. Statistical significativity has been fixed at $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***.

III. Results

1. General aspect

- *Weight*

When weight was considered, a significant main effect of ages [$F(4,170)=63.91$, $p<0.001$] and genotypes [$F(4,170)=57.71$, $p<0.001$] were identified. The age x genotype interaction [$F(4,170)=5.51$, $p<0.001$] was significant. Post-hoc analysis revealed a statistically significant reduced weight in Plp null mice compared to WT mice at the ages of 9, 12 and 15 months ($p<0.01$ at 12 months, $p<0.001$ at 9 and 15 months, PLSD Fischer test) (**Table 1**).

	Wild-type	Plp null	
3 months	25.29 \pm 0.34	24.35 \pm 0.43	NS
6 months	28.37 \pm 0.50	27.82 \pm 0.40	NS
9 months	31.44 \pm 0.64	27.94 \pm 0.36	***
12 months	34.41 \pm 1.11	30.69 \pm 0.38	**
15 months	34.67 \pm 0.67	29.81 \pm 0.31	***

Table 1: Body weight of wild-type and Plp null mice at 3, 6, 9, 12 and 15 months of age.

** $p<0.01$ and *** $p<0.001$, PLSD Fisher test. NS : non significant.

2. Motor behavior

- *Open field*

When the spontaneous locomotor activity was considered as the total distance traveled in the open field, a significant main effect of genotypes [$F(1,170)=57.59$, $p<0.001$] but not ages [$F(4,170)=2.36$, $p=0.055$] was identified. The age x genotype interaction [$F(4,170)=12.17$, $p<0.001$] was significant. Post-hoc analysis revealed a statistically significant increase in the locomotor activity of Plp null mice compared to WT mice at the ages of 9, 12 and 15 months ($p<0.001$, PLSD Fischer test) (**Fig.2a**).

When the anxiogenic character of the open field is considered as the time spent in the central zone of the apparatus, a significant main effect of genotypes [$F(1,170)= 7.28$, $p<0.01$] and ages [$F(4,170)= 5.92$, $p<0.001$] was identified. The age x genotype interaction [$F(4,170)=1.33$, $p>0.05$] was not significant. Post-hoc analysis revealed a statistically significant increase in the time spent in central area for Plp null mice compared to WT mice at the ages of 12 and 15 months ($p<0.001$ and $p<0.05$, PLSD Fischer test, respectively) (**Fig.2b**).

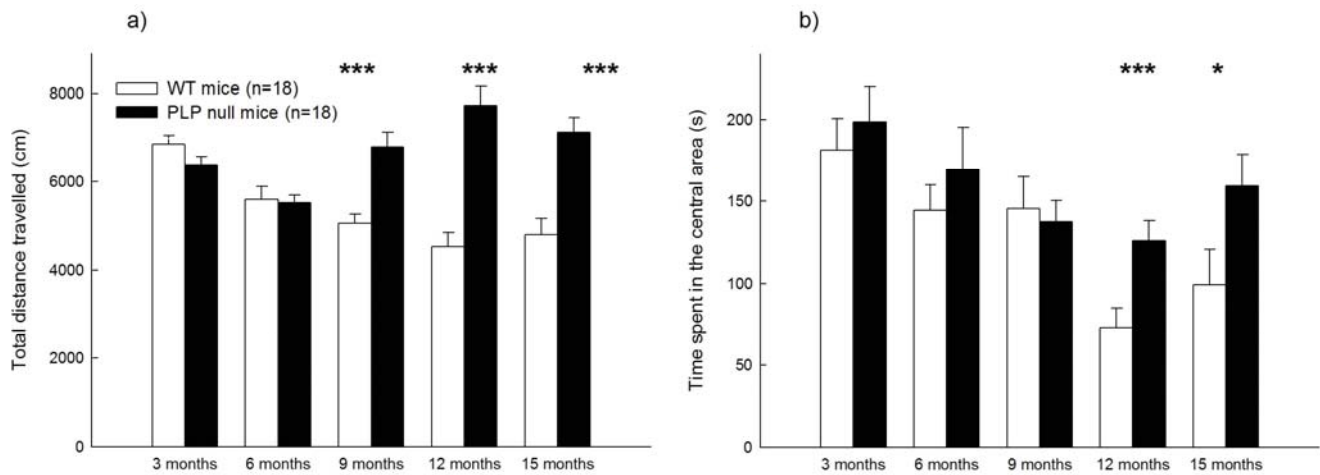


Figure 2. Spontaneous locomotor activity in wild-type and Plp null mice at 3, 6, 9, 12 and 15 months of age.

a) The locomotor activity of wild-type and Plp null mice was expressed as total distance traveled \pm S.E.M. for the overall 15-min session.

b) The anxiogenic character of the open field for wild-type and Plp null mice was expressed as the time spent in the central area \pm S.E.M. for the overall 15-min session.

* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, PLSD Fisher test.

- *Rotarod*

When the rotarod performance was considered, a significant main effect of ages [$F(4,170)=6.05$, $p < 0.001$] but not genotypes [$F(1,170)=2.40$, $p > 0.05$] was identified. No age x genotype interaction [$F(4,170)=0.64$, $p > 0.05$] was identified (**Fig.3**).

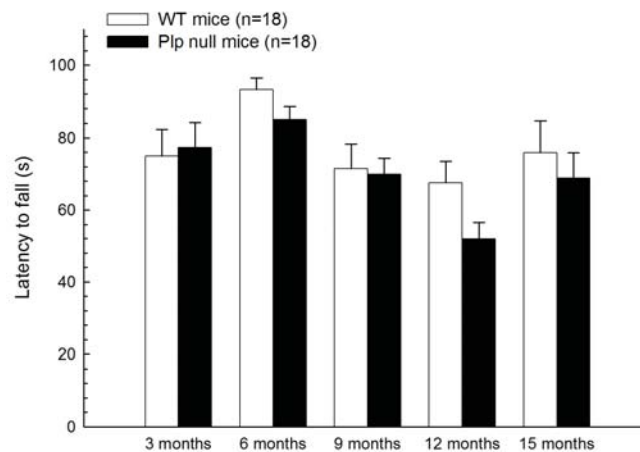


Figure 3. Rotarod performance in wild-type and Plp null mice at 3, 6, 9, 12 and 15 months of age.

The performance of wild-type and Plp null mice was expressed as the mean latency to fall \pm S.E.M. for the five rotarod session performed by each mouse.

- *Grip test*

When the forelimb strength was considered, a significant main effect of ages [$F(4,170)=7.88$, $p<0.001$] and genotypes [$F(1,170)=41.87$, $p<0.001$] was identified. No age x genotype interaction [$F(4,170)=0.64$, $p>0.05$] was identified. Post-hoc analysis revealed a statistically significant decrease in Plp null mice grip strength compared to WT mice at ages of 9, 12 and 15 months ($p<0.05$ at 9 months, $p<0.001$ at 12 and 15 months, PLSD Fischer test) (**Fig.4a**).

When the hind- and fore-limb strength was considered, a significant main effect of ages [$F(4,170)=6.52$, $p<0.001$] and genotypes [$F(1,170)=132.48$, $p<0.001$] was identified. The age x genotype interaction [$F(4,170)=7.44$, $p<0.001$] was significant. Post-hoc analysis revealed a statistically significant decrease in Plp null mice grip strength compared to WT mice at each age tested ($p<0.05$ at 6 months, $p<0.001$ at 3, 9, 12 and 15 months, PLSD Fischer test) (**Fig.4b**).

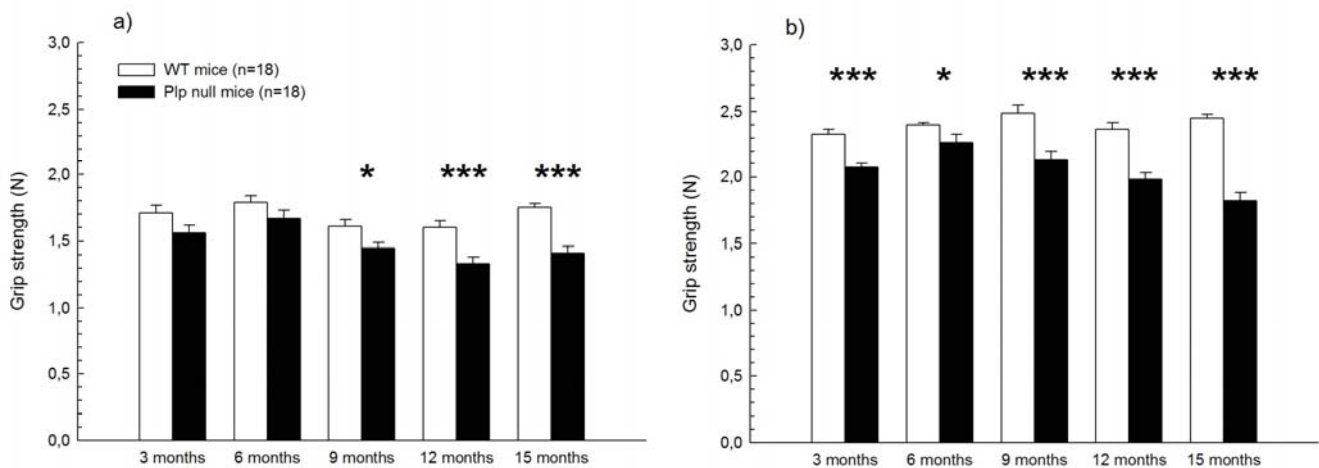


Figure 4. Grip strength performance in wild-type and Plp null mice at 3, 6, 9, 12 and 15 months of age.

The performance of wild-type and Plp null mice was expressed as the mean grip strength \pm S.E.M. for the five assays performed by each mice with forelimb (a) or hind- and fore-limb (b).

* $p<0.05$ and *** $p<0.001$, PLSD Fisher test.

3. Auditory evoked potential

When the latencies of the evoked response were considered and analyzed with an ANOVA with repeated measures, a significant main effect of genotypes [$F(1,41)=111.34$, $p<0.001$], ages [$F(2,41)=96.02$, $p<0.001$] and waves [$F(3,123)=985.54$, $p<0.001$] was identified. The age x genotype interaction [$F(2,41)=206.34$, $p<0.001$] was significant and the waves x ages, the waves x genotypes and the waves x ages x genotypes was also significant [$F(6,123)=286.45$, $F(3,123)=286.99$, $F(6,123)=377.18$, respectively, $p<0.001$] (**Fig.5**).

At six month of age, ANOVA with repeated measures revealed that the latency of the evoked response was different over waves trials [$F(3,42)=558.31$, $p<0.001$] but not between genotypes [$F(1,14)=2.22$, $p>0.05$] (**Fig.5**).

At nine month of age, ANOVA with repeated measures revealed that the latency of the evoked response was different over the waves trials [$F(3,42)=667.00$, $p<0.001$] and between genotypes [$F(1,14)=11.60$, $p<0.01$]. Post-hoc analysis revealed a statistically significant increase in latencies for waves II, III and IV in Plp null mice compared to WT mice ($p<0.05$ for the wave II, $p<0.01$ for the wave III, $p<0.001$ for the wave IV, PLSD Fisher test) (**Fig.5**).

At fifteen months of age, ANOVA with repeated measures revealed that the latency of the evoked response was different over the wave trials [$F(3,39)=214.35$, $p<0.001$] and between genotypes [$F(1,13)=856.19$, $p<0.001$]. Post-hoc analysis revealed a statistically significant increase in latencies for the waves III and IV in Plp null mice compared to WT mice ($p<0.001$, PLSD Fisher test) (**Fig.5**).

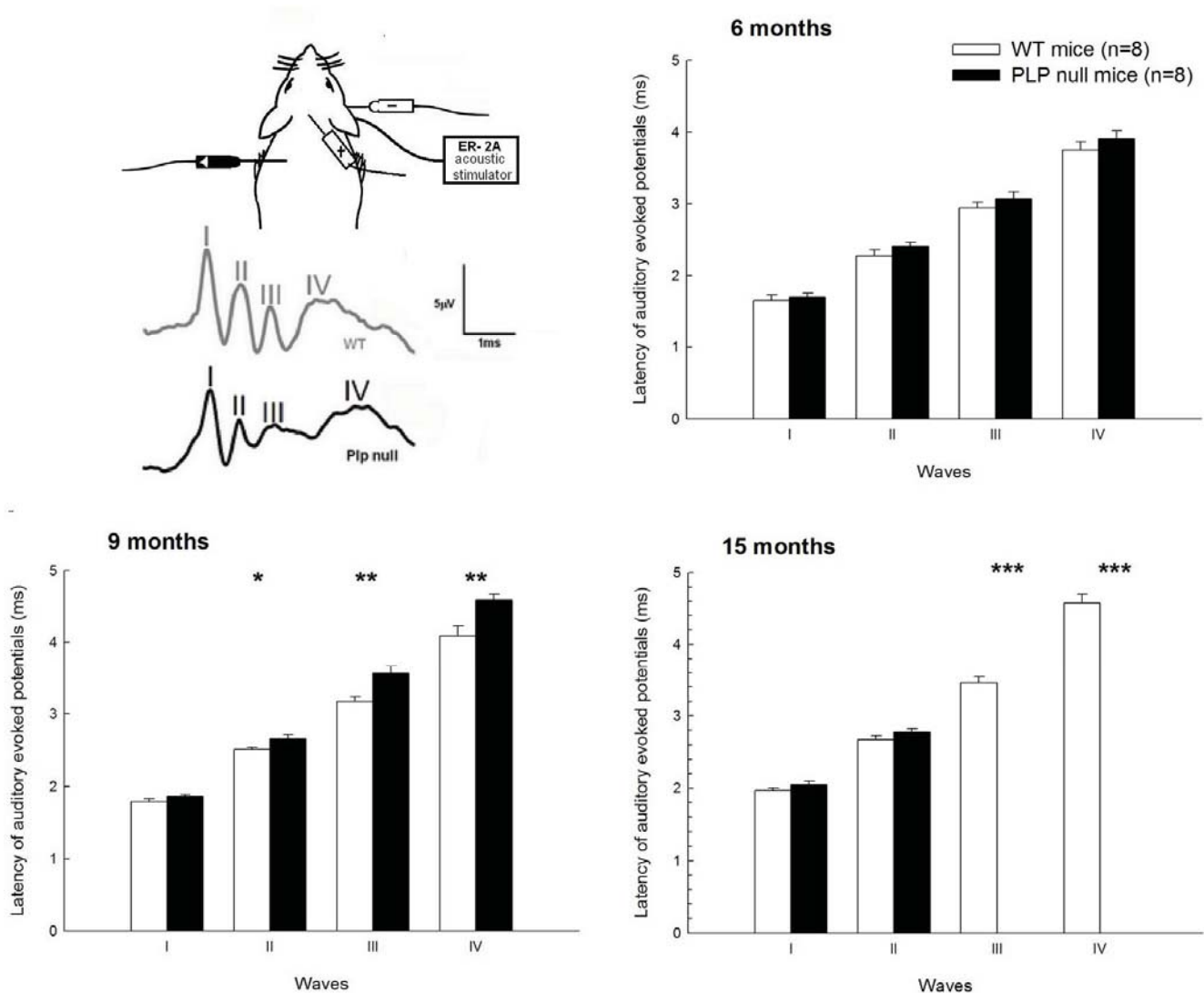


Figure 5. Auditory evoked potential in wild-type and Plp null mice at 6, 9 and 15 months of age.

Auditory evoked potentials of wild-type and Plp null mice were expressed as the latency of the evoked response \pm S.E.M. for the four waves in 6-, 9- and 15-month-old mice.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$, PLSD Fisher test.

4. Cognitive behaviors

- *Y-maze:*

When the percentage of spontaneous alternation was considered, a significant main effect of genotypes [$F(4,170)=8.263$, $p<0.01$] but not ages [$F(1,170)=2.34$, $p>0.05$] was identified. No ages x genotypes interaction [$F(4,170)=1.73$, $p>0.05$] was identified. Post-hoc analysis revealed a statistically significant decrease in the percentage of alternation in 12-month-old Plp null mice compared to WT mice ($p<0.001$, PLSD Fischer test) (**Fig.6a**).

When the total number of entries was considered, a significant main effect of ages [$F(4,170)=3.63$, $p<0.01$] but not genotypes [$F(1,170)=0.43$, $p>0.05$] was identified. No ages x genotypes interaction [$F(4,170)=0.17$, $p>0.05$] was identified (**Fig.6b**).

When the latency to enter in the first new arm was considered, a significant main effect of genotypes [$F(4,170)=25.87$, $p<0.001$] but not ages [$F(1,170)=1.75$, $p>0.05$] was identified. No ages x genotypes interaction [$F(4,170)=0.37$, $p>0.05$] was identified. Post-hoc analysis revealed a statistically significant increase in latencies to enter the first new arm in Plp null mice compared to WT mice at all the ages tested ($p<0.05$ at 3, 6 and 15 months, $p<0.01$ at 9 and 12 months, PLSD Fischer test) (**Fig.6b**).

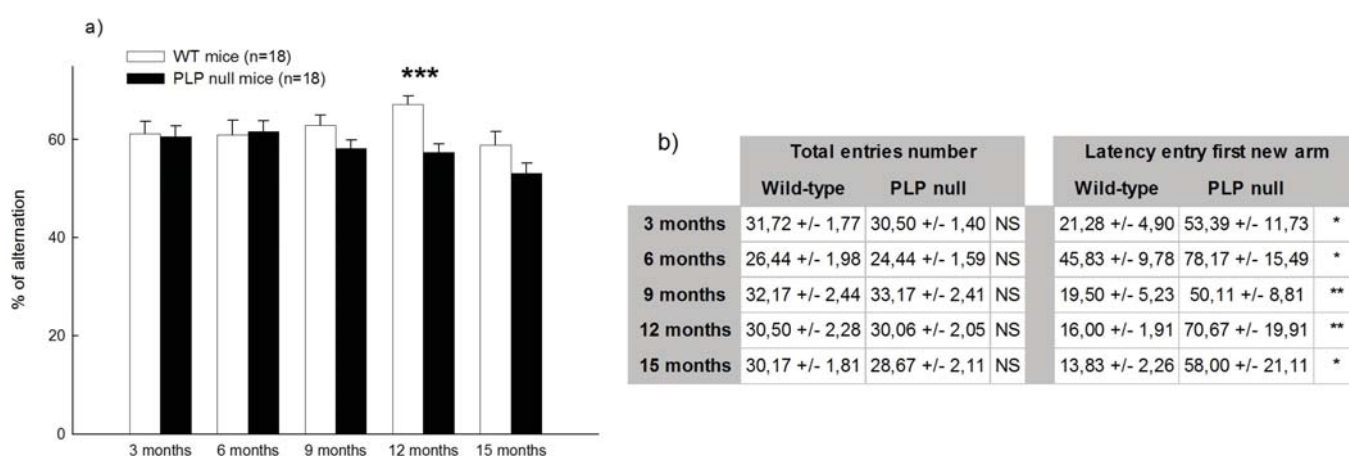


Figure 6. Y-maze performance in wild-type and Plp null mice at 3, 6, 9, 12 and 15 months of age.

The performance of wild-type and Plp null mice was expressed as the mean alternation ratio \pm S.E.M.

(a) the average number of arm entries \pm S.E.M. and the latency to enter in the first new arm \pm S.E.M. (b) for the overall 10-min session.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$, PLSD Fisher test. NS: non significant.

- *Object recognition test*

With an IT of 10 minutes, when the percentage of recognition was considered, no significant main effect of genotype [$F(1,170)=2.46$, $p>0.05$] nor age [$F(4,170)=0.79$, $p>0.05$] was identified. No age x genotype interaction [$F(4,170)=1.01$, $p>0.05$] was identified (**Fig.7a**).

With an ITI of 60 minutes, when the percentage of recognition was considered, no significant main effect of genotype [$F(1,170)=0.26$, $p>0.05$] nor age [$F(4,170)=0.26$, $p>0.05$] was identified. No age x genotype interaction [$F(4,170)=1.10$, $p>0.05$] was identified (**Fig.7b**).

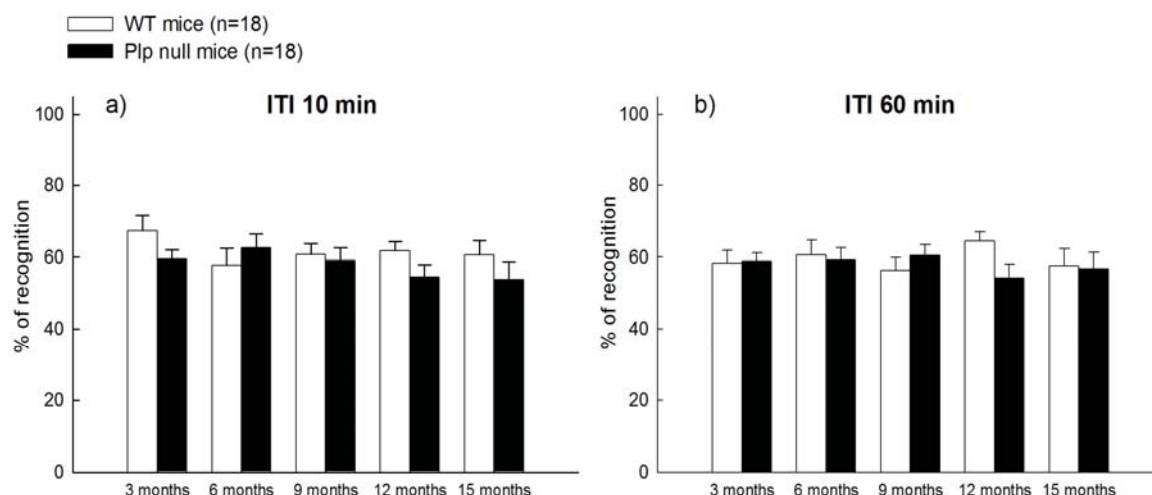


Figure 7. Object recognition performances in wild-type and Plp null mice at 3, 6, 9, 12 and 15 months of age. The performance of wild-type and Plp null mice was expressed as percentage of novel object recognition \pm S.E.M. (a) with an ITI of 10 minutes. (b) with an ITI of 60 minutes.

- *Sociability and social recognition*

When the percentage of social recognition was considered, a significant main effect of genotype [$F(1,170)=4.16$, $p<0.05$] but not age [$F(4,170)=1.71$, $p>0.05$] was identified. No age x genotype interaction [$F(4,170)=0.09$, $p>0.05$] was identified. Post-hoc analysis revealed no statistically significant difference between WT and Plp null mice at all ages tested (PLSD Fischer test) (**Fig.8a**).

When the sociability index was considered, significant main effect of age [$F(4,170)=4.31$, $p<0.01$] but not genotype [$F(1,170)=1.07$, $p>0.05$] was identified. No age x genotype interaction [$F(4,170)=0.37$, $p>0.05$] was identified (**Fig.8b**).

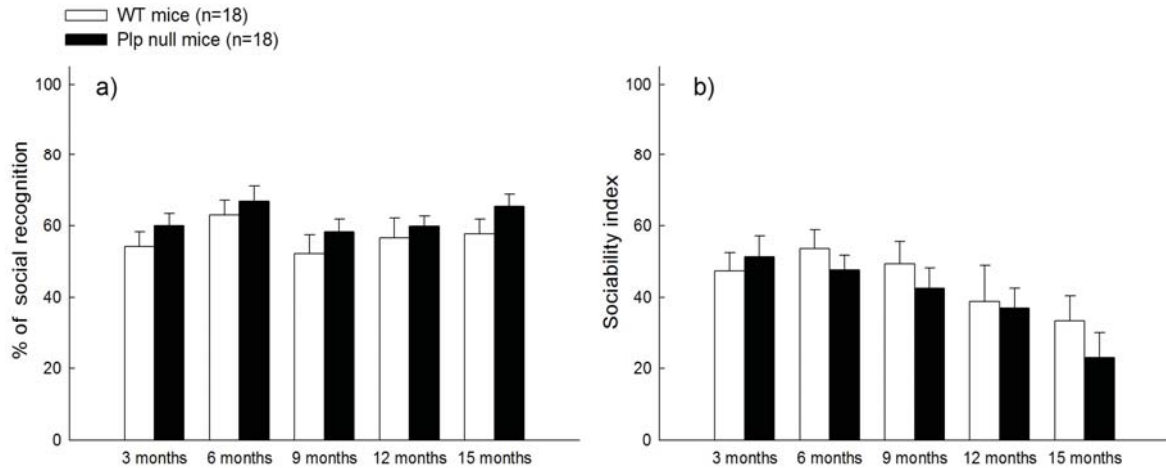


Figure 8. Sociability and social recognition performances in wild-type and Plp null mice at 3, 6, 9, 12 and 15 months of age.

(a) Percentage of social recognition \pm S.E.M of wild-type and Plp null mice
 (b) Sociability index \pm S.E.M of wild-type and Plp null mice.

- *Elevated plus maze*

When the spontaneous locomotor activity was considered as the total number of entries into the different arms, a significant main effect of genotypes [$F(1,170)=31.24$, $p<0.001$] and ages [$F(4,170)=8.31$, $p=0.001$] was identified. The ages x genotypes interaction was also significant [$F(4,170)=4.93$, $p<0.001$]. Post-hoc analysis revealed a statistically significant increase in the total number of entries by Plp null mice compared to WT mice at 6, 9, 12 and 15 months of age ($p<0.05$ at 6 and 9 months, $p<0.01$ at 15 months and $p<0.001$, PLSD Fischer test) (**Fig.9a**).

When the anxiogenic aspect of the elevated plus maze is considered as the time spent in the open arms of the apparatus, a significant main effect of genotypes [$F(1,170)=35.09$, $p<0.001$] and ages [$F(4,170)=15.45$, $p<0.001$] was identified. The ages x genotypes interaction was also significant [$F(4,170)=16.92$, $p<0.001$]. Post-hoc analysis revealed a statistically significant decrease in the time spent in the open arms by 3-month-old Plp null mice compared to WT mice ($p<0.01$, PLSD Fischer test) and a significant increase from 6 months of age ($p<0.05$ at 6 and 9 months, and $p<0.001$ at 12 and 15 months, PLSD Fischer test) (**Fig.9b**).

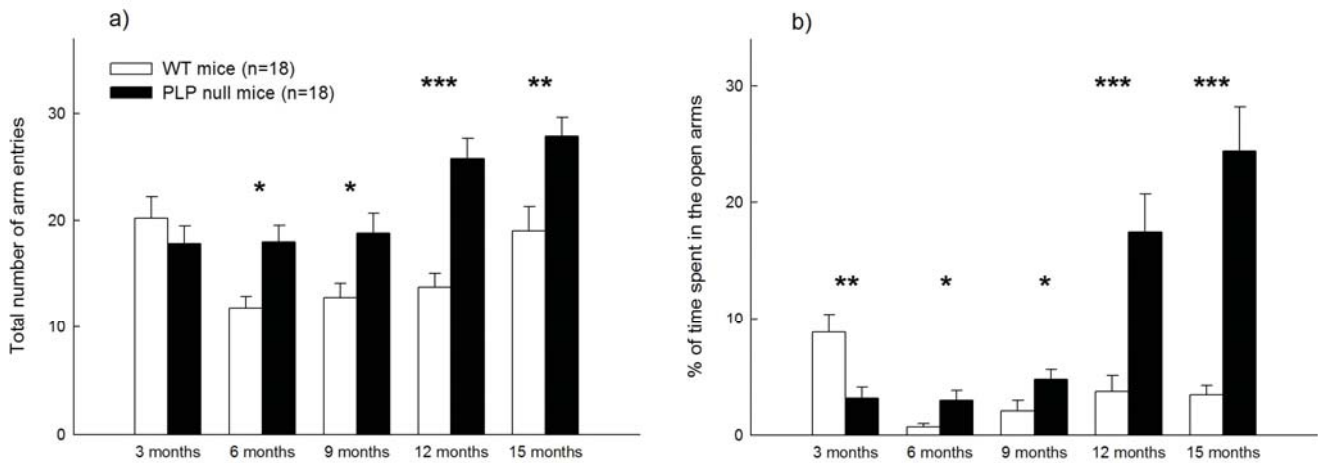


Figure 9. Elevated plus maze performance of wild-type and Plp null mice at 3, 6, 9, 12 and 15 months of age.

a) The locomotor activity of wild-type and Plp null mice was expressed as total number of entries into the different arms \pm S.E.M. for the overall 10-min session.

b) The anxiogenic character of the elevated plus maze for wild-type and Plp null mice was expressed as the time spent in the open arms \pm S.E.M. for the overall 10-min session.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, PLSD Fisher test.

- *Marble burying test:*

When the total number of marble buried was considered, a significant main effect of age [$F(4,170)=9.26$, $P < 0.001$] and genotypes [$F(1,170)=103.33$, $p < 0.001$] was identified. The age x genotypes interaction [$F(4,170)=3.77$, $p < 0.01$] was significant. Post-hoc analysis revealed a statistically significant decrease in the number of marble buried by Plp null mice compared to WT mice from 6 to 15 months of age ($p < 0.05$ at 6 months, $p < 0.001$ at 9, 12 and 15 months, PLSD Fischer test) (**Fig.10**).

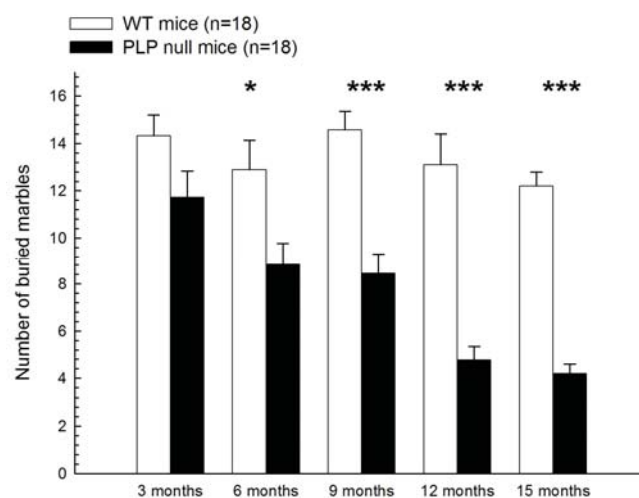


Figure 10. Marble burying performance in wild-type and Plp null mice at 3, 6, 9, 12 and 15 months of age.

The performance of wild-type and Plp null mice was expressed as the total number of marble buried for the overall 30-min session.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, PLSD Fisher test.

5. PCR Array analyses

- Quantitative RNA expression using SABiosciences RT2 Profiler PCR Arrays

Considering the 84 genes analyzed on the “Neurogenesis” plate (**Fig.11A**), it appeared that in 15-day-old Plp null mice compared to age matched WT mice, 1 gene (*Nptx1*) was up-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) and 25 genes (*Apbb1*, *Bai1*, *Cdk5rap2*, *Cdk5rap3*, *Dll1*, *Dvl3*, *ErbB2*, *Fgf2*, *Hdac4*, *Hey1*, *Mll1*, *Ncoa6*, *Ndn*, *Nrcam*, *Pafah1b1*, *Pax3*, *Pou3f3*, *Pou4f1*, *Ptn*, *Rac1*, *S100a6*, *Slit2*, *Stat3*, *Vegfa*, *Ywhah*) were down-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test). In 3-month-old Plp null mice compared to age matched WT mice, only 1 gene (*Artn*) was down-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test). Finally, in 15-month-old Plp null mice compared to age matched WT mice, 1 gene (*Shh*) was up-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) and 5 genes (*Apbb1*, *Bai1*, *Cdk5r1*, *Cdk5rap2*, *Gpi1*) were down-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test).

Considering the 84 genes analyzed on the “Neurotrophins and receptors” plate (**Fig.11B**), it appeared that in 15-day-old Plp null mice compared to age matched WT mice, no gene was up- or down-regulated. In 3-month-old Plp null mice compared to age matched WT mice, 1 gene (*Nrg4*) was up-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) and 6 genes (*Hctr2*, *Hspb1*, *Il6*, *Il6ra*, *Mc2r*, *Tro*) were down-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test). Finally, in 15-month-old Plp null mice compared to age matched WT mice, 11 genes (*Artn*, *Crhbp*, *Cxcr4*, *Fgfr1*, *Il10ra*, *Il6ra*, *Maged1*, *Nf1*, *Tgfa*, *Tro*, *Trp53*) were up-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) and 1 gene (*Ptger2*) was down-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test).

Considering the 84 genes analyzed on the “Neurotransmitters receptors and regulators” plate (**Fig.11C**), it appeared that in 15-day-old Plp null mice compared to age matched WT mice, 2 genes (*Chat*, *Chrm1*) were up-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) and 3 genes (*Gabrg1*, *Galr3*, *Nmur2*) were down-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test). In 3-month-old Plp null mice compared to age matched WT mice, 6 genes (*Chrm4*, *Chrna7*, *Chrb2*, *Gabrr2*, *Gla4*, *Nmur1*) were up-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) and 6 genes (*Drd2*, *Gabra3*, *Gabrb2*, *Gla1*, *Gla2*, *Npy1r*) were down-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test). Finally, in 15-month-old Plp null mice compared to age matched WT mice, 3 genes (*Chrna1*, *Gabrr2*, *Gla4*) were up-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) and 2 genes (*Slc5a7*, *Sstr4*) were down-regulated ($p < 0.05$, Mann-Whitney test).

- *Quantitative RNA expression using Taqman technology*

Following results obtained with quantitative RNA expression using SABiosciences RT2 Profiler PCR Arrays, 13 genes of interest were selected to confirm their up- or down-regulated profile, with Taqman technology by analyzing now each individually ADNc of each mouse instead of a pool of ADNc of 4 mice with the same genotype. Five genes were analyzed from the “Neurogenesis” plate: *Bai1*, *Cdk5rap2*, *ErbB2*, *S100a6*, *Shh*; two genes from the “Neurotrophins and receptors” plate: *Il6*, *Il6ra*, and six genes from the “Receptors of neurotransmitters and regulators” plate: *Chrna1*, *Chrna7*, *Gabrb2*, *Gabbr2*, *Gla4*, *Nmur1*. For a more complete analysis, we added markers of oligodendrocytes development *Olig2* and *Mbp*, marker of neuronal development, *Nestin*, and astrocytic development, *Gfap*.

Considering genes expression rates in 15-days-old Plp null mice compare to WT mice at the same age (**Fig.12A**), analyses revealed that *S100a6* was down-regulated ($p < 0.01$, Student t-test) and, *Chrna1* and *Gla4* were up-regulated ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, Student t-test).

Considering genes expression rates in 3-month-old Plp null mice compare to age matched WT mice (**Fig.12B**), analyses revealed that *S100a6*, *Il6*, *Gabbr2*, *Gla4*, *Gfap* and *Olig2* were up-regulated ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively, Student t-test).

Considering genes expression rates in 15-month-old Plp null mice compare to age matched WT mice (**Fig.12C**), analyses revealed that *mbp* and *Chrna1* were down-regulated ($p < 0.05$, Student t-test) and *S100a6*, *Shh*, *Gabrb2*, *Gabbr2*, *Gla4*, and *Gfap* were up-regulated ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively, Student t-test).

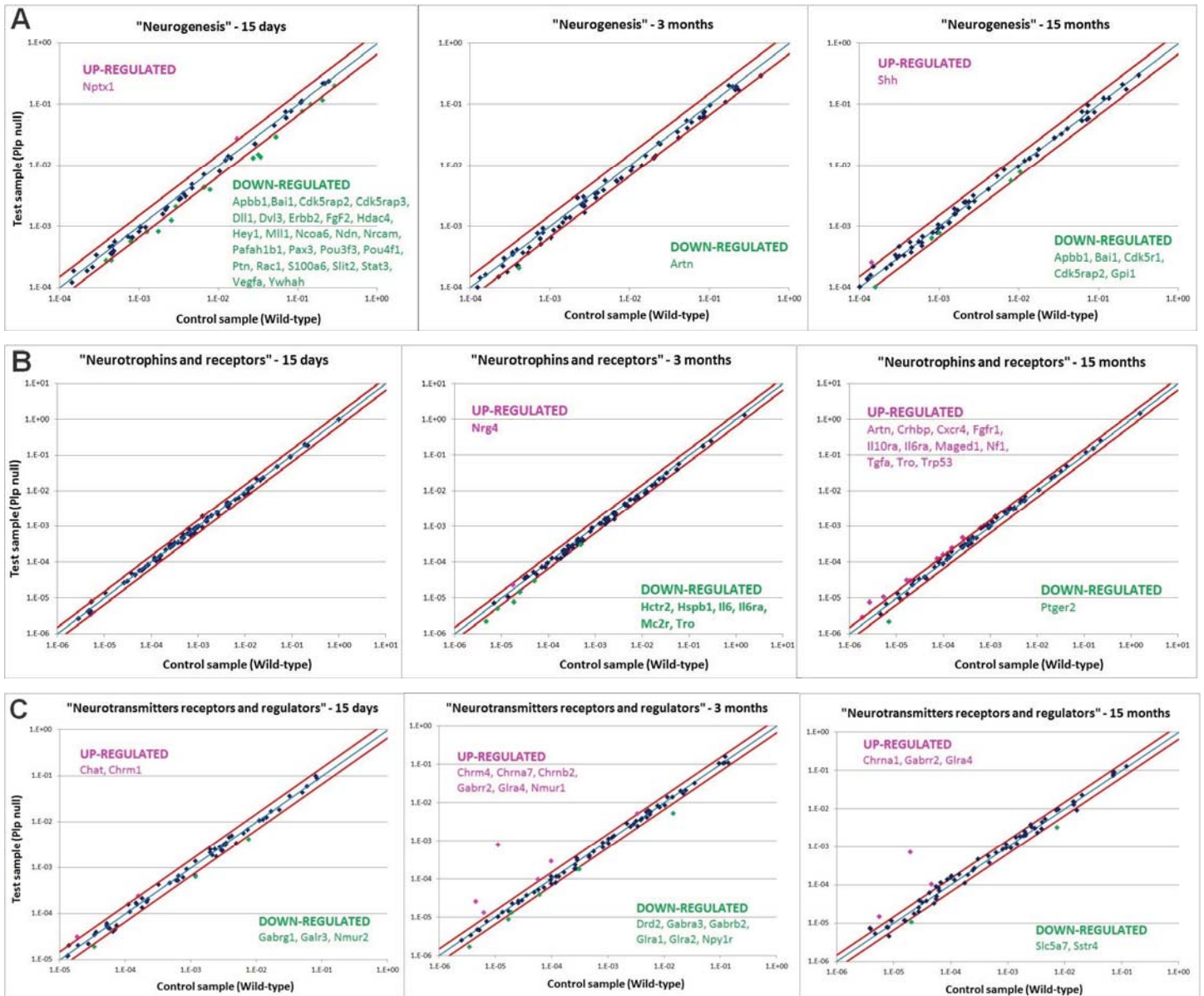


Figure 11. Analysis of RNA levels of genes implicated in “Neurogenesis” (A), “Neurotrophins and receptors” (B) and “Neurotransmitters receptors and regulators” (C), in Plp null mice compared to wild-type mice at 15 days, 3 months and 15 months of age, using quantitative RT-PCR arrays.

The blue line indicates fold changes ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) of 1. The red lines indicate a fold-change of 1.5 in gene expression threshold. Plots of gene expression with a fold change are displayed, with Plp null mice (y-axis) and control wild type mice (x-axis). Up-regulated genes are shown in pink, whereas down-regulated genes are shown in green. Genes expression is expressed with calculation $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ compared to the endogenous control gene *Actb* and *gapdh*.

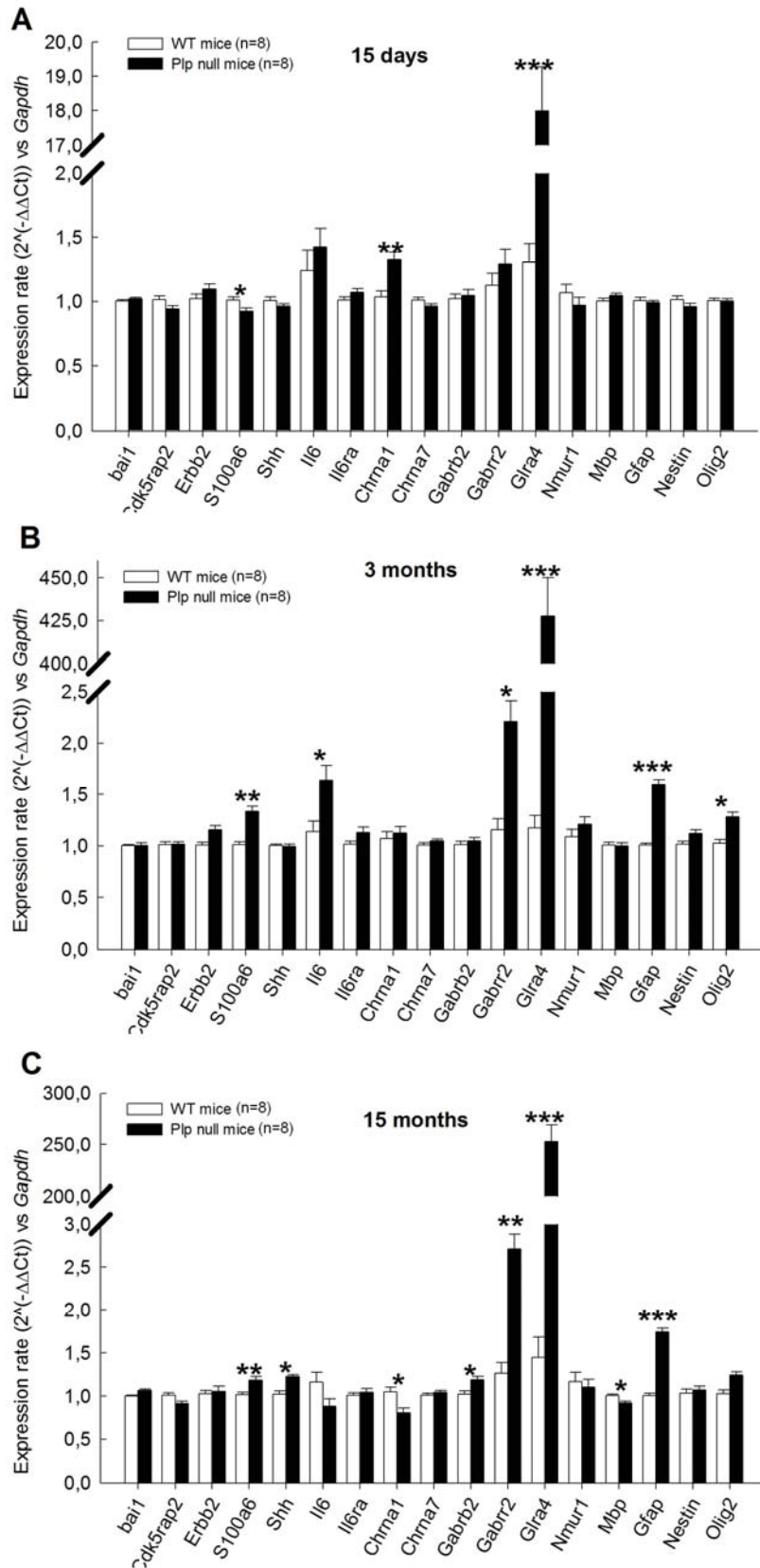


Figure 12. Analysis of expression rate of genes of interest in Plp null mice compared to wild-type mice at 15 days (A), 3 months (B) and 15 months (C) of age. The expression rate is expressed with calculation $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ compared to the endogenous control gene Gapdh.
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student t-test)

6. Immunohistological analyses of Plp null and WT mice brains

The neuronal cell bodies immunostaining using NeuN revealed no statistical difference between 15-month-old WT and Plp null mice in the dentate gyrus (intern and superficial cellular layers), nor in the CA3 region of the hippocampus (**Fig.13**).

The astrocytes immunostaining using GFAP revealed no statistical difference between 15-month-old WT and Plp null mice in the superficial cellular layer of the dentate gyrus. However, there is a decrease of GFAP staining in Plp null mice compared to WT mice in the intern layer of the dentate gyrus and in the CA3 region ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively, Student t-test) (**Fig.14**).

The CB immunostaining revealed no statistical difference between 15-month-old WT and Plp null mice in the superficial or in the intern cellular layers of the dentate gyrus. However, there is a decrease of CB staining in Plp null mice compared to WT mice in the CA3 region ($p<0.05$, Student t-test) (**Fig.15**).

The PV immunostaining revealed no difference between 15-month-old WT and Plp null mice in all the areas investigated in the hippocampus (**Fig.16**).

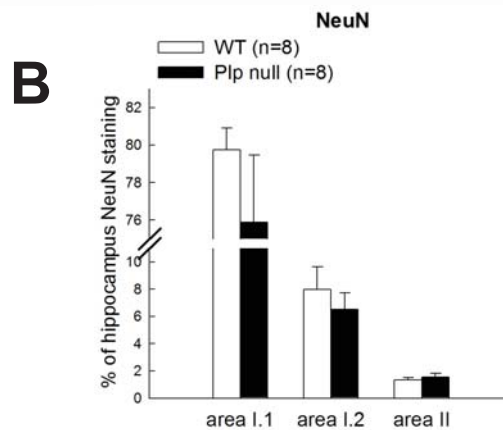
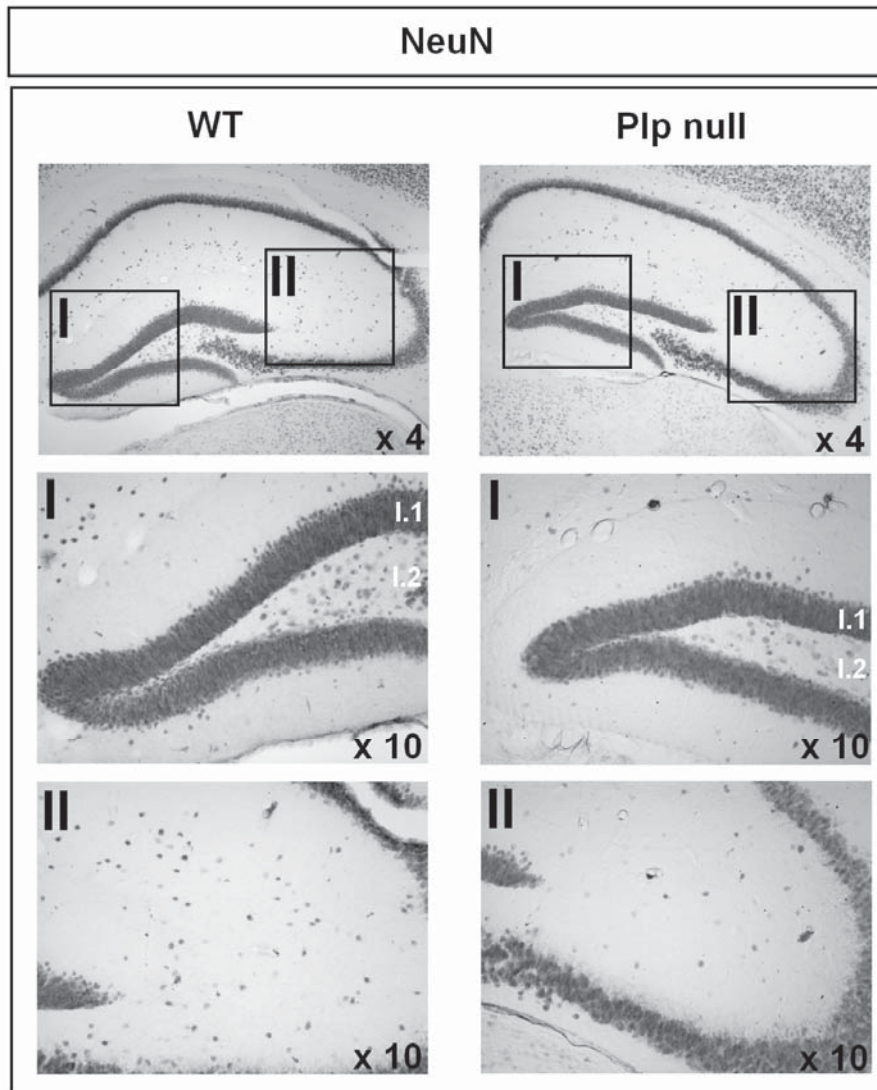
A

Figure 13. Expression of neuron-specific nuclear protein, NeuN, in the hippocampus of 15-month-old Plp null and wild-type (WT) mice.

(A) Pictures show examples of NeuN staining in the hippocampus of Plp null and WT mice with magnification x 4 (on top) and with magnification x10, on area I representative of dentate gyrus (middle) and area II representative of the CA3 region (down). In the area I, two zones were distinguished; the superficial cellular layer (I.1) and the intern cellular layer (I.2).

(B) Graphic shows the quantification of NeuN staining in the distinctive areas of the hippocampus. Results are expressed as mean value \pm SEM.

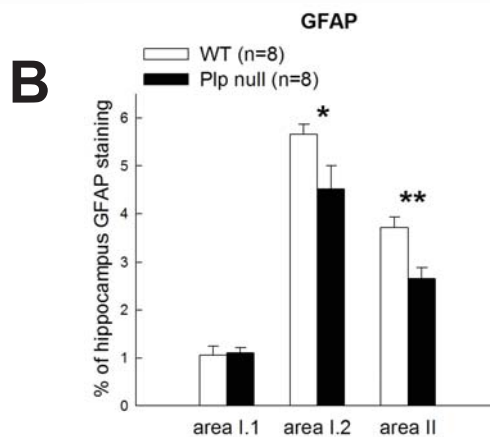
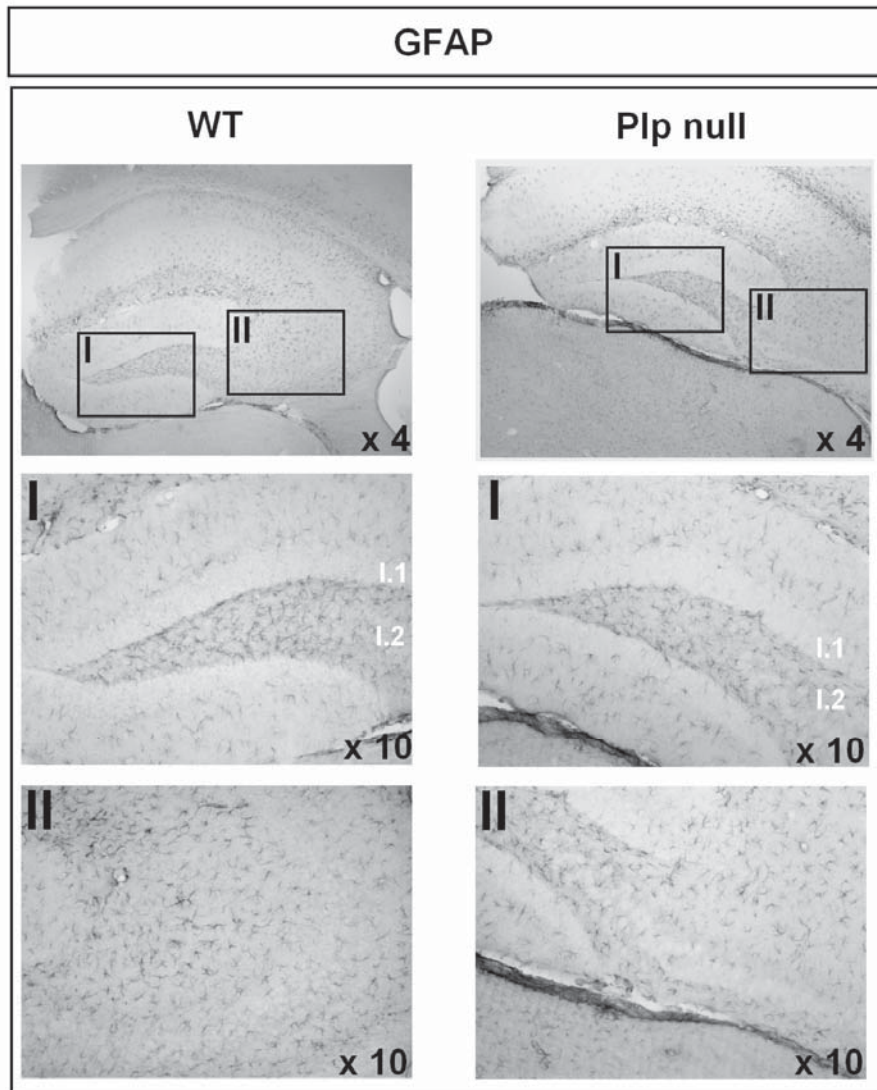
A

Figure 14. Expression of astrocyte reactivity, by GFAP staining, in the hippocampus of 15-month-old Plp null and wild-type (WT) mice.

(A) Pictures show examples of GFAP staining in the hippocampus of Plp null and WT mice with magnification x 4 (on top) and with magnification x10, on area I representative of the dentate gyrus (middle) and area II representative of the CA3 region (down). In the area I, two zones were distinguished; the superficial cellular layer (I.1) and the intern cellular layer (I.2). (B) Graphic shows the quantification of GFAP staining in the distinctive areas of the hippocampus. Results are expressed as mean value \pm SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student-*t*-test).

A

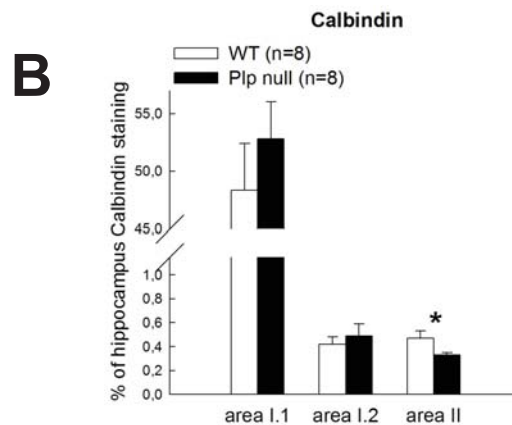
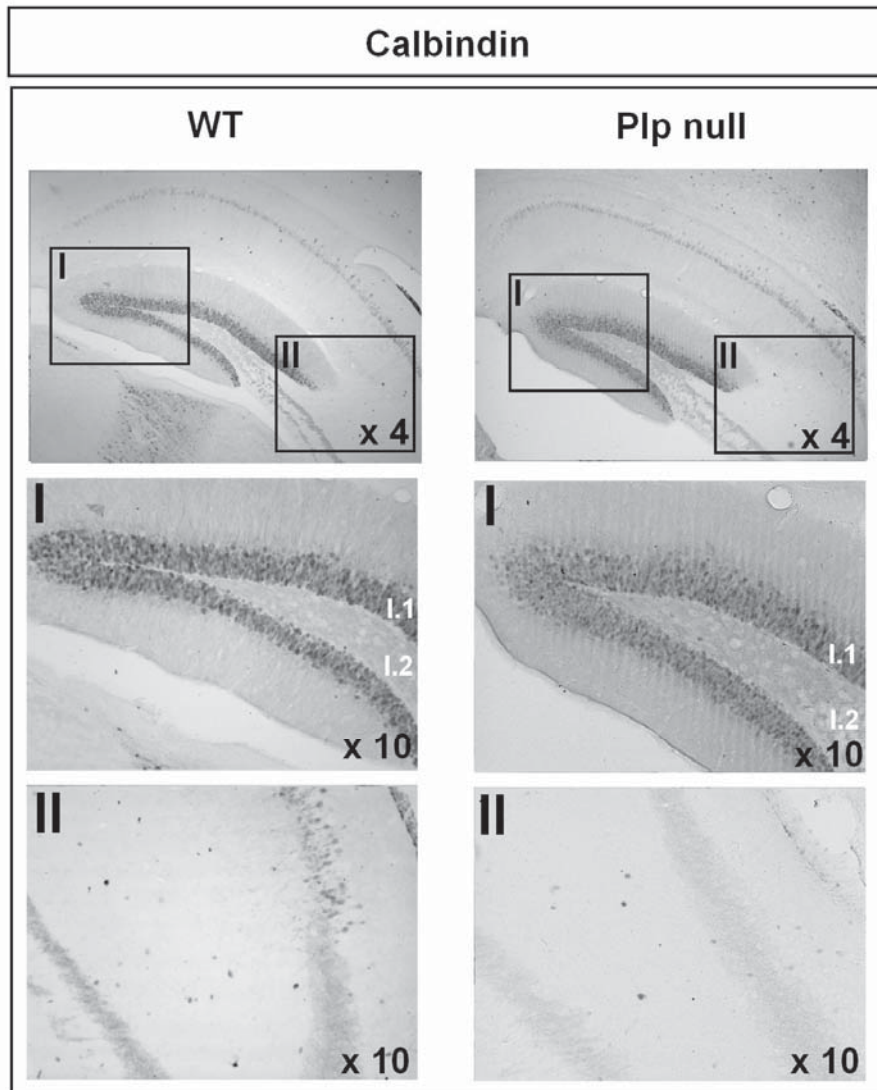


Figure 15. Expression of calbindin in the hippocampus of 15-month-old Plp null and wild-type (WT) mice.

(A) Pictures show examples of CB staining in the hippocampus of Plp null and WT mice with magnification x 4 (on top) and with magnification x10, on area I representative of dentate gyrus (middle) and area II representative of the CA3 region (down). In the area I, two zones were distinguished; the superficial cellular layer (I.1) and the intern cellular layer (I.2).

(B) Graphic shows the quantification of calbindin staining in the distinctive areas of the hippocampus. Results are expressed as mean value \pm SEM. (* $p < 0.05$, Student-*t*-test).

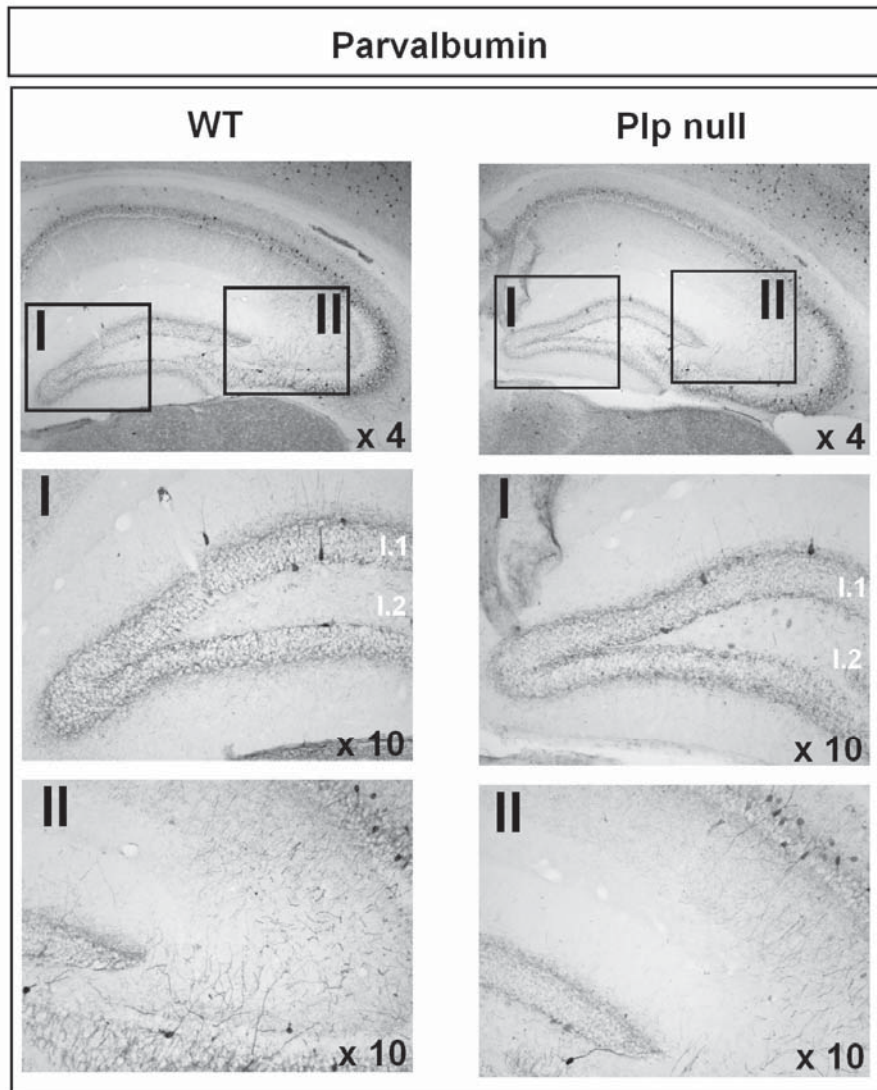
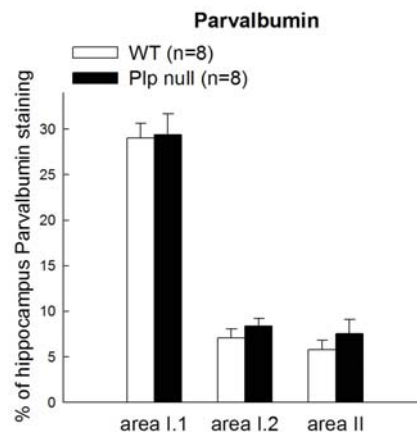
A**B**

Figure 16. Expression of parvalbumin in the hippocampus of 15-month-old Plp null and wild-type (WT) mice.

(A) Pictures show examples of PV staining in the hippocampus of Plp null and WT mice with magnification x 4 (on top) and with magnification x10, on area I representative of the dentate gyrus (middle) and area II representative of the CA3 region (down). In the area I, two zones were distinguished; the superficial cellular layer (I.1) and the intern cellular layer (I.2).

(B) Graphic shows the quantification of PV staining in the distinctive areas of the hippocampus. Results are expressed as mean value \pm SEM.

IV. Discussion

Our study aimed to evaluate the cognitive consequences of PLP null expression in mice. This study was feasible because motor outcome are milder in this form compared to PLP overexpression, allowing an accurate evaluation of cognitive functions. In Plp null mice, while the neuropathological abnormalities have been extensively described (Griffiths et al., 1998; Garbern et al., 2002; Edgar et al., 2004; Rosenbluth et al., 2006), no behavioral analysis has been realized except the evaluation of motor coordination using rotarod test (Griffiths et al., 1998; Yin et al., 2006). We then initiated longitudinal behavioral studies with repeated testing of mice at different ages considering that these time-consuming studies are of importance to finely evaluate the onset and evolution of behavioral impairments in relation to graded neuropathological stages. To refine the screening of Plp null mice we combined the analysis of motor behaviors with those of cognitive ones. This allowed us to show that Plp null mice associated motor weakness with alterations of working memory and dysfunctions in behaviors related to anxiety. Electrophysiological analysis showed that these behavioral dysfunctions were associated with age appearance decrease in central conduction velocity. We then performed a gene expression assay on brain sample to determine cellular substrates for the identified behavioral abnormalities and showed (1) important modifications of mRNA involved in the neurogenesis in 15-day-old Plp null mice; (2) modifications in some neurotransmitter systems. Finally, the immunohistological study showed a decrease in GFAP and calbindin expressions in some hippocampus areas.

PLP null mice exhibit motor dysfunctions with notably early appearance of muscular fatigue

Until now, behavioral analysis in Plp null mice was restricted to rotarod analysis. In the first description of Plp null mice, Klugman et al., described no difference between genotype in rotarod performance at 6 and 12 months (Klugmann et al., 1997). In following experiments, Griffiths et al., described a decrease in rotarod performances in 16-month-old Plp null mice and then Yin et al., reported abnormalities in 12-month-old mice (Griffiths et al., 1998; Yin et al., 2006). Discrepancies in literature could be explained by the difference of the rotation program used in the experiments or the fact that rotarod is a test whose results are difficult to homogenize according to the data base eumorphia (www.eumorphia.org) underlying the importance of numerous factors (strain, weight, stress, protocol...) influencing performances. In this study, using an accelerating protocol from 4 to 40 rpm on 5 minutes, we failed to observe any difference between genotypes whatever the age tested. We tested older animals (data not shown) and found abnormalities in 18- and 21-month-old Plp null mice.

The extensive evaluation of motor function showed that Plp null mice exhibit a severe and early (since the age of 3 months when four paws are tested) muscular fatigue. This fatigue worsens with age. The delayed appearance of statistical difference between genotypes for hind-limb grip strength compared to

hind- and fore-limb grip strength (9 vs. 3 months) suggest that fore-limbs might be affected before hind-limbs. This is in accordance with the earliest apparition of axonal degeneration in long axonal pathways (Garbern et al., 1997, 2002).

Finally, a last aspect of the motor behavior was assessed, i.e. the spontaneous locomotor activity using an open-field apparatus. Contrary to what we might have expected in a mouse model of spastic paraplegia, Plp null mice exhibit a severe increase in locomotor activity. This increase appeared at 9 months of age and worsened with age. According to the other motor behavioral results, this increase in the locomotor activity cannot be relied to a better muscular function, but more probably to hyperactivity linked to cognitive defects. This hypothesis is supported by the increase in the time spent in the open field central area also observed in Plp null mice. We can imagine that this hyperactivity, would be able to mask to some extent the coordination defects in Plp null mice and then explain the lack of rotarod difference until 16-18 (depending on the studies) months of age.

Plp null mice exhibit cognitive dysfunction and notably early unsuitable behaviors related to anxiety

As said previously, the increase of time spent in the central area of the open field strongly suggests abnormal response to anxiogenic stimulus in Plp null mice. To better characterized behaviors related to anxiety in these mice we performed two usual anxiety tests, namely the elevated plus maze and the marble burying test. In the elevated plus maze, Plp null mice exhibited a severe increase in the time spent in the open arms when they reached the age of 6 months. It should be noted that while WT mice decrease the time they spend in the open arm with age, Plp null mice increase it. This difference in the age-dependent evolution of the anxiety behavior explains the opposite difference between genotypes at 3 months of age (i.e. WT mice spending more time in the open arms than Plp null mice).

Results obtained in the marble burying test are consistent with the former. Plp null mice have buried largely less of marbles than WT mice have done. These results could suggest a decrease of interest for the environment in Plp null mice, but it clearly confirms the presence of unsuitable behaviors related to anxiety in these mice.

Plp null mice exhibit working memory, but no episodic memory defects

In order to better characterize the Plp null mice cognitive defects, we assessed different aspects of memory functions: the long term and short term episodic memory and the working memory. In a first experiment, we determined working memory in Plp mice using the Y maze test. We observed a decrease in the percentage of alternation, an index of working memory, in older Plp null mice compared to WT mice. Strikingly, the Y maze test also showed abnormality in behaviors related to anxiety in Plp null mice, since these mice spent more time to enter in the first new arm compared to WT mice.

Nonetheless, this increase in the latency to enter in the first new arm had no consequence on the locomotor activity in the maze since Plp null mice realized the same number of entries in arm than WT mice.

We then evaluated short and long term episodic memory using the object recognition test but we failed to identify difference between genotypes whatever the age tested. Episodic memory was also assessed in its social component using the social recognition test. Results obtained concerning the % of exploration of the new intruder confirmed the lack of difference of episodic memory between Plp null and WT mice. This test also allowed to show the absence of social interaction defect in Plp null mice.

Taking together, these results argue for moderate memory impairments in Plp null mice affecting only some component of memory, and notably the working memory one.

Behavioral dysfunctions are associated in Plp null mice with a decrease in the central nerve conduction of auditory evoked potentials

Compared to WT mice, Plp null mice showed an increase in latencies for waves II, III and IV of auditory evoked potentials at 9 months of age, and the absence of wave III and IV at 15 months of age. ABR being originating from the ninth cranial nerve (waves I and II) and brainstem auditory structures (waves III and IV), these results are consistent with an impairment of the central part of the auditory nerve pathways. In Plp null mice these central conduction auditory defects progress with age and the evolution of the disease, as it has also been observed in SPG2 patients.

Delay in appearance of ABR waves is currently associated to demyelination. In fact, in the auditory nerve, a majority of neurons are myelinated and poorly myelinated fibers have an increased membrane time constant (Cragg and Thomas, 1964; Brismar, 1981; Rasminsky, 1984), hence, they may require a longer period of time to integrate sufficient charge to reach a threshold potential, resulting in decreased conduction velocity.

Then, results obtained for the auditory evoked potentials, constitute an interesting index of demyelination *in vivo*.

Plp null mice exhibit abnormalities in some genes expressions implicated in cognition

To potentiate the study of up- or down-regulated genes in Plp null mice compared to WT mice at 15 days, 3 months and 15 months of age, we achieved two types of gene expression analyses. In a first step, for a thoroughly researched panel of relevant pathway-focused genes, we used the SABiosciences RT² Profiler PCR Arrays technology and focused our analysis on 3 pathways: “neurogenesis”, “neurotrophins and receptors”, “neurotransmitters receptors and regulators” on pools of cDNA. In a second step, to improve the statistical power of the analysis, we confirmed the relevant data obtained with the SABiosciences technology using Taqman technology on individual mouse cDNA.

The SABiosciences technology with predesigned plates revealed expression abnormalities in many genes expressed in the three predesigned plates at all tested ages, except for 15-day-old samples in the “neurotrophins and receptors” plate. Concerning the “neurogenesis” aspect, the important proportion of deregulated genes in Plp null mice from 15 days of age, suggest that they exhibit an important defect of mechanisms implicated in neurogenesis which could explain later alterations observed in these mice. Concerning the “neurotrophins and receptors” aspect, we observe an increasing proportion of deregulated genes with age. Finally concerning the “neurotransmitters receptors and regulators” aspect, results suggest an alteration of neurotransmission processes at all ages tested that could explain behavioral alterations.

We then selected 13 genes of interest and tried to confirm their up- or down-regulated profile, with Taqman technology. Genes were selected because they were: deregulated at two ages, greatly up- or down-regulated or with a potential interest in cognitive processes. If for some genes (Gabrr2, shh, Glra4), the results obtained with SABiosciences techniques were confirmed with Taqman analysis, for many other, we found discrepancies between the 2 techniques. Thus even if it appears that Plp null mice exhibit abnormalities in numerous processes with a putative important role in cognitive functions, it was difficult to clearly conclude on the expression of these genes.

Several hypotheses could explain the differences in genes expression between the two studies: (1) there are a technical differences between the two technologies used (SYBR Green with primers compared to fluorescent probes) which could lead to different sensitivities, (2) first study was realized with cDNA pools while the second one was achieved on individual cDNA which could exacerbate inter-individual variations, (3) the statistical weight of data was hugely increased in the second studies as we had 32 data for a given age and a given genotypes (4 results for 8 mice) compared to only 4 data in the first study (2 data for 2 pools).

Finally, we can note with both techniques a huge up-regulation of Glra4 at all ages tested. Even if it remains to clarify this data at the proteins level, this up-regulation is more probably an artifact of the transgene construction introduced for the invalidation of the *Plp1* gene. In fact the Glra4 gene is in antisense upstream the Plp1 gene on the X chromosome and can then be transcript by the thymidine kinase promoter of surprising. If it is the case, Glra4 mRNA is probably not translated to proteins.

Histological abnormalities supplying cognitive dysfunction in Plp null mice

Because cognitive dysfunctions observed in Plp null mice mainly concerned behaviors related to anxiety and working memory, we focused our immunohistological study on hippocampus, a brain structure imply in these behaviors. However, other structures like amygdala or prefrontal cortex could also be very relevant for such analysis. This immunohistological investigation revealed some abnormalities in Plp null mice. While the global number of neurons and the PV-expressing subtypes are not affected, Plp null

mice exhibit a decrease in GFAP staining in the intern cellular layer of the dentate gyrus and CA3 associated with a decrease of CB-expressing neurons only in CA3.

GFAP is the main intermediate filament protein in mature astrocytes but also an important component of the cytoskeleton in astrocytes during development and can play a role in many cellular processes (Middeldorp and Hol, 2011). Classically GFAP is known to be induced upon brain damage or during CNS degeneration revealing reactive gliosis. Such increase in GFAP immunostaining has been observed in dorsal horn of Plp null mice taking part probably to thermal hypersensitivity observed in these mice (Depiets et al., 2012, in preparation). However, very strikingly, the GFAP immunostaining is not increased but decreased in Plp null mice hippocampi. A decrease in GFAP expression in different brain areas has also been correlated to depression (Johnston-Wilson et al., 2000; Müller et al., 2001; Si et al., 2004). As GFAP is involved in many cellular processes in the brain such as cell motility or proliferation, neurite outgrowth, myelination and synaptic plasticity, the decrease in GFAP expression could have consequences on these processes (Middeldorp and Hol, 2011). An implication in synaptic plasticity could be very relevant to the decrease in working memory observed in our mice.

The two proteins, CB and PV, are members of the EF-hand family of calcium-binding proteins. These proteins have been shown to be located in some specific neurons and are now considered to be a group of excellent chemical markers displaying area and lamellar distinctions in various regions of the brain as well as in some specific subpopulations of neurons (Fujimaru et Kosaka, 1996). Although PV is considered to be contained in the GABAergic non-pyramidal cells in the cerebral cortex and hippocampus of rodents, CB is reported to be contained not only in so-called GABAergic non-pyramidal cells but also in non-GABAergic principle cells such as cortical pyramidal cells in layer 2/3, dentate granule cells, CA1 pyramidal cells, subicular and presubicular pyramidal cells. In this study, we observed no ectopic expression of both PV and CB expressing cells, and observed only a decrease in the number of CB expressing cells in the CA3 part of the hippocampus of Plp null mice. Then behavioral defects observed in Plp null mice are not linked to major disorganization of hippocampus lamellar organization. As CB has been shown to be more effective in reducing intracellular calcium concentrations than other calcium-binding proteins (Mattson et al., 1991), to protect neurons from oxidative stress (Dowd, 1995) and to be neuroprotective (Sloviter, 1989; Ince et al., 1993), the decreased expression of CB could have consequences on hippocampal functions.

Neurological impairments in Plp null mice: relevance to the implication of white matter in cognition

PLP seems to be particularly implicated in the myelin stability, suggesting that myelin without PLP is inherently unstable and eventually breaks down with age. It is hypothesized that human or mice lacking PLP have normal myelin during the early stages of development (first years in human and weeks in

mice) when myelination peaks. Myelin would then break down leading to progressive neurological deterioration (Boison et Stoffel, 1994; Klugmann et al., 1997; Griffiths et al., 1998). The clinical courses of our affected patients and mice are consistent with this hypothesis, with behavioral and electrophysiological impairments with age. Very strikingly, this neurological does not affect only the motor functions, but also cognitive ones in both human and mouse.

Recently, Nave and others suggested that demyelination and axonal degeneration could be largely more implicated in neurological and psychiatric disease than what we believed until now (Fields, 2008; Nave, 2010). Notably, Nave proposed that hypomyelination and reduced conduction velocity in long axons could limit the distance over which cortical neurons can fire in synchrony. The absence of long-range γ -oscillations between cortical subfields could then cause attention deficits. Myelin defects in long axons would also perturb spike-timing-dependent plasticity, which underlies synaptic strengthening or weakening (long-term potentiation or long-term depression) and possibly long-range circuit refinements (Nave, 2010). Given their close similarity with human SPG2 disease and the presence of cognitive dysfunctions, Plp null mice represent a very interesting model to evaluate these new exciting hypotheses.

References

- Boison D, Stoffel W (1994) Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11709–11713.
- Brismar T (1981) Electrical properties of isolated demyelinated rat nerve fibres. *Acta Physiol Scand* 113:161–166.
- Cragg BG, Thomas PK (1964) Changes in nerve conduction in experimental allergic neuritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 27:106–115.
- Depiets B, Giraudet F, Bechon C, Bardin L, Avan P, Boespflug-Tanguy O, Begou M (2012) Lack of the major myelin protein causes central sensitization of thermal painful stimuli.
- Dowd DR (1995) Calcium regulation of apoptosis. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 30:255–280.
- Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang S-C, Fowler JH, Montague P, Barrie JA, McCulloch MC, Duncan ID, Garbern J, Nave KA, Griffiths IR (2004) Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 166:121–131.
- Fields RD (2008) White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci* 31:361–370.
- Fujimaru Y, Kosaka T (1996) The distribution of two calcium binding proteins, calbindin D-28K and parvalbumin, in the entorhinal cortex of the adult mouse. *Neurosci Res* 24:329–343.
- Garbern JY et al. (1997) Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin. *Neuron* 19:205–218.
- Garbern JY, Cambi F, Lewis R, Shy M, Sima A, Kraft G, Vallat JM, Bosch EP, Hodes ME, Dlouhy S, Raskind W, Bird T, Macklin W, Kamholz J (1999) Peripheral neuropathy caused by proteolipid protein gene mutations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 883:351–365.
- Garbern JY, Yool DA, Moore GJ, Wilds IB, Faulk MW, Klugmann M, Nave K-A, Siertermans EA, van der Knaap MS, Bird TD, Shy ME, Kamholz JA, Griffiths IR (2002) Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain* 125:551–561.

- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280:1610–1613.
- Hassen WB, Bégou M, Traore A, Moussa AB, Boehm N, Ghandour MS, Renou J-P, Boespflug-Tanguy O, Bonny J-M (2009) Characterisation of spinal cord in a mouse model of spastic paraplegia related to abnormal axono-myelin interactions by in vivo quantitative MRI. *Neuroimage* 46:1–9.
- Hobson GM, Huang Z, Sperle K, Stables DL, Marks HG, Cambi F (2002) A PLP splicing abnormality is associated with an unusual presentation of PMD. *Ann Neurol* 52:477–488.
- Hodes ME, Blank CA, Pratt VM, Morales J, Napier J, Dlouhy SR (1997) Nonsense mutation in exon 3 of the proteolipid protein gene (PLP) in a family with an unusual form of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Med Genet* 69:121–125.
- Ince P, Stout N, Shaw P, Slade J, Hunziker W, Heizmann CW, Baimbridge KG (1993) Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 19:291–299.
- Johnston-Wilson NL, Sims CD, Hofmann JP, Anderson L, Shore AD, Torrey EF, Yolken RH (2000) Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry* 5:142–149.
- Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA (1997) Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18:59–70.
- Mandillo S et al. (2008) Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol Genomics* 34:243–255.
- Mattson MP, Rychlik B, Chu C, Christakos S (1991) Evidence for calcium-reducing and excitatory-protective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 6:41–51.
- Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology* 93:421–443.
- Müller MB, Lucassen PJ, Yassouridis A, Hoogendijk WJ, Holsboer F, Swaab DF (2001) Neither major depression nor glucocorticoid treatment affects the cellular integrity of the human hippocampus. *Eur J Neurosci* 14:1603–1612.
- Nave K-A (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468:244–252.
- Rasminsky M (1984) Pathophysiology of Demyelination. *Annals of the New York Academy of Sciences* 436:68–80.
- Rosenbluth J, Nave K, Mierzwa A, Schiff R (2006) Subtle myelin defects in PLP null mice. *Glia* 54:172–182.
- Si X, Miguel-Hidalgo JJ, O'Dwyer G, Stockmeier CA, Rajkowska G (2004) Age-dependent reductions in the level of glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology* 29:2088–2096.
- Sloviter RS (1989) Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol* 280:183–196.
- Yin X, Baek RC, Kirschner DA, Peterson A, Fujii Y, Nave K-A, Macklin WB, Trapp BD (2006) Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin. *J Cell Biol* 172:469–478.

Article 3

"Effect of a neuroleptic treatment on abnormal behavior induced by lack of PLP1, the major myelin protein of central nervous system"

Article 3. “Effect of a neuroleptic treatment on abnormal behavior induced by lack of PLP1, the major myelin protein of central nervous system”

I. Présentation et méthodologie

Au cours des deux précédentes études, nous avons montré que les souris présentant une invalidation du gène *Plp1* développaient des déficits moteurs, cognitifs et sensitifs (Depiets et al., 2012a, 2012b, en préparation). En effet, nous avons mis en évidence chez ces souris *Plp* null des troubles moteurs marqués par une diminution de la force musculaire avec peu d'anomalies de la coordination motrice, mais également des troubles d'ordre cognitif, marqués par une forte augmentation de l'activité locomotrice, une dérégulation du comportement anxieux et une altération de la mémoire de travail apparaissant avec l'âge. A cela s'ajoute des troubles du comportement sensitif tels qu'une hyperalgésie thermique dès l'âge de 3 mois. Ces altérations, d'apparition plus ou moins précoce, représentent des marqueurs intéressants pour évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques, qui sont jusqu'à aujourd'hui particulièrement rares pour le traitement des symptômes liés à la SPG2. Dans cette étude, nous avons donc évalué l'effet de la risperidone sur les comportements moteurs (rotarod, open-field, test d'agrippement et test de la grille), cognitifs (labyrinthe en Y, labyrinthe en croix surélevé, test d'enfouissement de billes de verre) et sensitifs (test d'immersion de la queue) des souris *Plp* null. A partir de l'âge de 7 mois, les souris transgéniques et sauvages sont traitées de manière chronique pendant 2 mois avec des doses de risperidone de 0,3 ou de 0,6 mg/kg/jour dans l'eau de boisson. Les analyses comportementales sont réalisées avant la première administration à 7 mois puis 2 semaines et 6 semaines après le début du traitement (**Figure 44**).

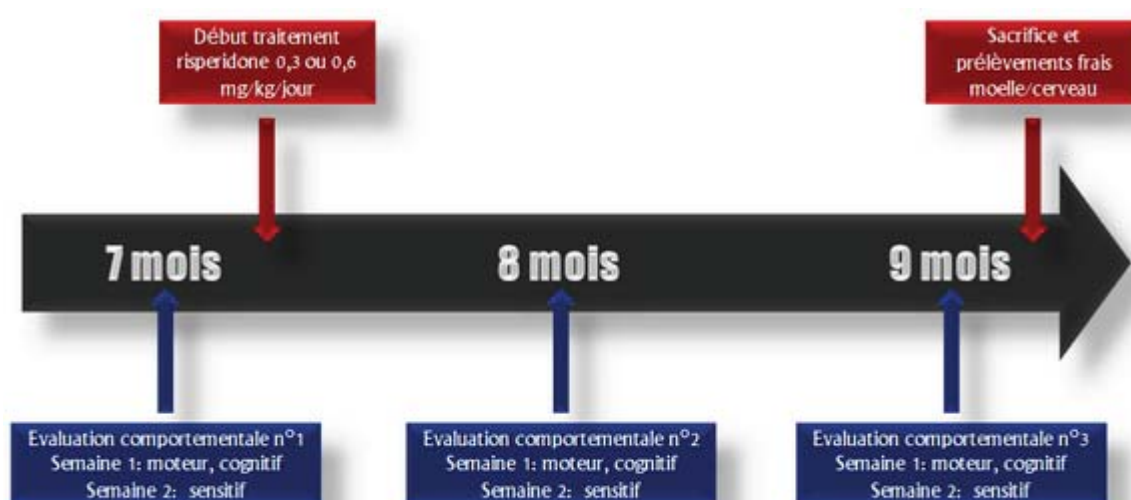


Figure 44. Schéma du plan expérimental de l'étude pour l'évaluation de l'efficacité de la risperidone sur les altérations comportementales des souris *Plp* null.

II. Résultats et discussion

Au cours de ce travail, les résultats obtenus pour les souris témoins consommant exclusivement de l'eau dépourvue de traitement, confirment, pour certains points, les précédentes données recueillies sur les souris *Plp* null (articles 1 et 2), c'est-à-dire (1) une augmentation de l'activité locomotrice associée à une augmentation du temps passé dans la zone centrale de l'open-field, (2) une diminution du pourcentage d'alternances associée à une augmentation du nombre d'entrées dans les bras du labyrinthe en Y, (3) une augmentation du temps passé dans les bras ouverts associée à une augmentation du nombre d'entrées dans les bras du labyrinthe en croix surélevé, et (4) une diminution du nombre de billes enfouies. En considérant toutes ces données, notre étude a montré une inefficacité de la risperidone que ce soit à la dose de 0,3 ou de 0,6 mg/kg/j à réduire les différences observées entre les génotypes. Seul le test d'enfouissement de billes de verre montre des différences corrigées par le traitement à la risperidone, mais cet effet, avec une diminution du nombre de billes enfouies pour la dose de 0,3 mg/kg/j et une augmentation pour la dose de 0,6 mg/kg/j, est plutôt surprenant et difficile à interpréter.

Nous avons également retrouvé, de manière cohérente avec nos précédentes études (articles 1 et 2) et la littérature (Griffiths et al., 1998b), une absence de différences entre les génotypes dans le test du rotarod permettant l'évaluation de la coordination motrice. L'évaluation sur un autre test moteur axé sur le comportement ataxique, le test de la grille, n'a pas non plus révélé de différence entre les génotypes aux âges testés. Il semblerait que sur cet aspect moteur, la délétion du gène *Plp1* chez la souris n'induit pas des conséquences similaires à celles observées chez les patients atteints de SPG2. Ceci pourrait s'expliquer par une souffrance axonale moins prononcée chez la souris du fait de la longueur plus courte des segments, ou encore par la position à 4 pattes de l'animal qui permettrait plus d'opportunités de compensation.

Dans cette étude, il est important de noter que si la plus forte dose de risperidone n'est pas capable de corriger la plupart des anomalies comportementales observées chez les souris *Plp* null, elle semble induire un effet sédatif dans certains tests, notamment ceux impliquant la sphère motrice, comme l'open-field, sans cependant aggraver les autres sphères comportementales, ni provoquer de somnolence identifiable au rotarod ou affecter la masse corporelle des souris, témoignant que la dose utilisée n'est pas trop importante. Cet effet n'est pas vraiment surprenant car des effets sédatifs de la risperidone ont déjà été décrits dans certaines études et seraient dus à une affinité importante de la risperidone pour les récepteurs histaminergiques H1 et dopaminergiques D2 (Cope et al., 2009; Richelson, 2010). Cependant, il s'agit d'un résultat intéressant quant à l'indication de la risperidone dans la SPG2, car

l'hyperactivité est un des dysfonctionnements comportemental fréquemment identifié chez les patients SPG2 et participant à la dégradation de leur qualité de vie.

Malgré les précautions prises dans l'élaboration du plan expérimental de cette étude, des réserves doivent cependant être émises concernant certains résultats qui ne sont pas cohérents avec les données que nous avons obtenues auparavant au laboratoire. C'est le cas de l'absence de différences entre les souris *Plp* null et sauvages non traitées d'un point de vue de (1) la masse corporelle qui est généralement inférieure chez les souris *Plp* null comparées aux souris sauvages, (2) la force musculaire pour laquelle nous avons décelé auparavant des altérations dès l'âge de 3 mois chez les souris *Plp* null, et (3) la latence de retrait de la queue pour laquelle nous avons observé auparavant une forte diminution de façon stable et précoce chez les souris *Plp* null. Suite à ces résultats contradictoires, les effets consécutifs au traitement antipsychotique sont donc pour ces paramètres difficilement interprétables. Cette divergence des résultats entre cette étude et les études précédentes réalisées au laboratoire peuvent s'expliquer, soit par une légère modification du phénotype des souris avec le temps, soit par un plan expérimental présentant quelques limites de conception. Sur ce deuxième point, plusieurs paramètres ont pu influencer les résultats ; un premier paramètre étant le fait que l'étude s'est déroulée en deux parties distinctes à quelques mois d'intervalle. En effet, les 2 doses de risperidone n'ont pas été évaluées en parallèle, mais séquentiellement à cause du nombre limité d'animaux disponibles aux âges souhaités. Il aurait été préférable de randomiser les deux doses sur les deux études, mais au début de ce travail nous ne savions pas si la dose de 0,3 mg/kg/j serait inefficace ou présenterait déjà des effets sédatifs. Un deuxième paramètre à prendre en compte est le comportement initial des animaux avant la mise en place de l'étude. En effet, préalablement à l'étude, les groupes de traitement ont été répartis par cage d'élevage, or certaines cages contenaient des individus très agressifs altérant ainsi le comportement de leurs congénères. Enfin un troisième paramètre à noter est le biais expérimental qui peut être amené par l'expérimentateur lui-même, les deux parties de l'étude n'ayant pas été réalisées par le même expérimentateur. Cependant, étant donné que certains paramètres comportementaux ont présenté des résultats identiques à ceux décrits précédemment (constituant probablement les tests les plus robustes), nous pouvons penser que les résultats du traitement sur ces paramètres conservés sont fiables et appuie la conclusion selon laquelle la risperidone n'a pas montré de réelle efficacité dans notre modèle de souris invalidée pour le gène *Plp1*.

Etant donné l'implication de nombreux systèmes de neurotransmission dans les fonctions cognitives (Millan, 2003; Khan et Muly, 2011; Deiana et al., 2011; Klinkenberg et al., 2011) et sensibles (Julius et Basbaum, 2001; Le Bars et Adam, 2002) et les propriétés multi-réceptorielles des antipsychotiques (APs) (Thomas, 2006; Meltzer et Huang, 2008), nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les APs pourraient avoir des effets bénéfiques sur les anomalies comportementales dues à une absence de PLP1. Des études récentes ont montré dans des modèles induits d'altérations de la SB que la démyélinisation était concomitante à une augmentation des niveaux de dopamine dans certaines régions cérébrales, comme le cortex préfrontal, provoquant des anomalies comportementales, et un stress oxydatif, délétère pour les OLs (Xu et al., 2009). La perte de l'intégrité de la gaine de myéline n'affecte pas seulement la communication entre les différentes aires cérébrales mais altère également la coordination et l'équilibre des différents systèmes cérébraux de neurotransmetteurs (Zhang et al., 2008a; Xu et al., 2010), inférant sur le comportement global, et particulièrement la composante cognitive. Ces auteurs ont mis en évidence, dans un modèle de démyélinisation induite par la cuprizone, des effets positifs de l'halopéridol (un AP classique), de la quetiapine et de la clozapine (des APs atypiques), sur les conséquences neurobiologiques, telles que la diminution de l'expression de MBP dans le cortex cérébral, l'activation microgliale et la prolifération astrocytaire, ainsi que sur les anomalies comportementales, telles que le déficit de l'inhibition de sursaut à un stimulus acoustique, la diminution des alternances spontanées au labyrinthe en Y et le déficit d'interactions sociales. Les auteurs ont également mis en évidence un effet protecteur des APs, notamment la clozapine, en atténuant les altérations de la SB due à la cuprizone dans le cortex préfrontal, dans le noyau caudé putamen et dans l'hippocampe. Nous avons donc supposé que la dysmyélinisation apparaissant chez les souris Plp null pourrait mener à des mécanismes biologiques similaires, et que les APs pourraient avoir une certaine efficacité dans notre modèle. Nous avons privilégié les APs atypiques du fait de leurs propriétés pharmacologiques plus complexes et donc leur meilleure tolérance comparés aux AP classiques (Miyamoto et al., 2005). Parmi les APs atypiques, bien que la clozapine et la quetiapine aient démontré leur efficacité dans des modèles murins, en vue du transfert potentiel vers l'Homme, ces drogues possèdent un intérêt réduit puisque la clozapine présente souvent des effets secondaires délétères limitant son utilisation et que la quetiapine n'est pas commercialisée dans beaucoup de pays, notamment la France. La risperidone paraissait donc un bon candidat du fait de son utilisation étendue, sa bonne tolérance chez l'Homme et ses propriétés moléculaires proches de celles de la quetiapine, comme une forte affinité pour les récepteurs dopaminergiques D₂, sérotoninergiques 5-HT_{2A} et adrénergiques alpha1 (Leysen et al., 1988; Miyamoto et al., 2005). De plus, le mode d'administration de la risperidone dans

l'eau de boisson était particulièrement intéressant dans le cadre d'expérimentations chez la souris, en permettant d'éviter le stress dû à des injections répétées. Une étude réalisée avec un modèle souris de schizophrénie, a montré que la risperidone administrée de façon chronique (0.3mg/kg/j, dans l'eau de boisson pendant 8 semaines) améliorait la sociabilité, là où les APs typiques restaient moins efficaces, corrigeait les anomalies du comportement anxieux, mais restait inefficace sur les déficits de mémoire de travail (Delotterie et al., 2010). Enfin, certains patients SPG2 ont déjà été traité à la risperidone et son efficacité sur certains symptômes s'est avérée dans quelques cas, malgré l'absence de rationnel physiopathologique (Boespflug-Tanguy, données personnelles).

III. Conclusion et perspectives

Hormis son action intéressante sur l'hyperactivité comportementale des souris *Plp* invalidée pour le gène *Plp1*, la risperidone ne s'est pas révélée être efficace sur toutes les altérations comportementales, que ce soit sur la composante cognitive ou sensitive.

En ce qui concerne les perspectives à ce travail, dans un premier temps, avant d'évaluer une autre molécule, il serait intéressant de rechercher de potentiels changements neurobiologiques chez les souris *Plp* null traitées à la risperidone. Il est possible que des modifications biologiques apparaissent suite au traitement par l'AP, mais que ces modifications soient trop modérées pour corriger complètement les anomalies comportementales. Pour évaluer cette hypothèse, il serait intéressant de déterminer, à partir des prélèvements de tissus frais de moelles épinière et de cerveaux réalisés à la fin de l'étude et conservés à -80°C jusqu'à aujourd'hui, le profil d'expression de certains bio-marqueurs identifiés comme dérégulés chez les souris *Plp* null dans les études précédentes (articles 1 et 2).

La seconde perspective à ce travail serait évidemment d'évaluer une autre drogue. Nous pourrions vérifier si d'autres APs atypiques ayant des propriétés similaires présenteraient des effets plus importants sur les altérations comportementales des souris *Plp* null. Il serait également intéressant d'évaluer l'efficacité d'inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine, comme la fluoxétine qui a montré des effets sur la prolifération astrocytaire et un effet neuroprotecteur dans le cadre d'une pathologie démyélinisante, la SEP (Patti et al., 2010). Mais concernant l'aspect sensitif de notre modèle, la fluoxétine semble présenter des limites quant à son efficacité dans les syndromes douloureux. Chez l'Homme, en cas de douleur neuropathique, le traitement de première intention semble être les antidépresseurs tricycliques, comme la clomipramine et l'imipramine, qui empêchent la recapture de certains neurotransmetteurs, comme la sérotonine et la norépinephrine, toutes deux influençant les voies descendantes de la douleur. En traitement de deuxième intention, les antiépileptiques,

comme la gabapentine, sont utilisés pour leur action présumée de modulateurs de l'excitabilité neuronale (Maizels and McCarberg, 2005; Sindrup et al., 2005). Ce mécanisme d'action, en plus de son intérêt pour l'hypersensibilité thermique pourrait s'avérer également intéressant pour traiter l'hyperactivité comportementale. Dans le cadre de la SEP, cette efficacité pourrait s'expliquer par le fait qu'un déficit cholinergique proviendrait de la rupture des voies cholinergiques et du déficit de transport axonal de l'acétylcholine suite à la démyélinisation et l'altération axonale. Enfin, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (l'enzyme de dégradation de l'acétylcholine), couramment utilisés dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, comme le donepezil, ont démontré leur efficacité sur les déficits cognitifs, particulièrement les fonctions exécutives, l'apprentissage et la mémoire de patients atteints de SEP (Krupp et al., 2004; Patti et al., 2010). Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase pourraient représenter également un potentiel espoir thérapeutique pour les patients SPG2.

IV. Article

Effect of a neuroleptic treatment on abnormal behavior induced by lack of PLP1, the major myelin protein of central nervous system

DEPIETS Bérengère ^{1,3}, PARIS Pauline¹, BECHON Céline ^{1,3}, VAURS-BARRIERE Catherine ^{1,4}, BOESPFLUG-TANGUY Odile ^{3,4}, BEGOU Mélina ^{1,3}

¹ University of Clermont-Ferrand, Medical faculty, Clermont-Ferrand, France

² CHU Robert Debré, reference center for "leukodystrophies", Paris, France

³ INSERM U676, Hôpital Robert Debré, Paris, France

⁴ GReD, INSERM U1103, University of Clermont-Ferrand, Medical faculty, France

Abstract

In human, deletion or truncating mutations in the proteolipoprotein 1 (*PLP1*) gene, coding the major central nervous system myelin proteins, PLP and DM20, cause mild form of X-linked dysmyelinating disorders, the type 2 spastic paraplegia. Motor signs with ataxia and spasticity are the classical manifestations of the pathology. However other symptoms such as cognitive and sensitive defects have been observed but poorly described. Transgenic mice with deletion of *Plp1* gene (Plp null mice) have been developed to mimic the human disease. In previous studies we have carefully described the behavior of these mice and showed, in addition to moderate alterations of motor behavior, cognitive defects defined as an increased locomotor activity associated with anxiety related disorders and a decrease in working memory abilities. We also showed that Plp null mice develop a thermal hyperalgesia as soon as 3 months of age. Given the implication of numerous neurotransmission systems in cognitive and sensitive functions and the multi-receptorial properties of antipsychotics, we hypothesized that these compounds could have beneficial effects on the behavioral abnormalities found in our model. This hypothesis is supported by the fact that atypical antipsychotics had already demonstrated beneficial effects in mouse models of induced demyelination. In this study, we then assess the efficacy of chronic treatment with risperidone at 2 doses, 0.3 or 0.6 mg/kg/day, on behavioral defects (motor, cognitive and sensitive) of Plp null mice from 7 to 9 months of age. Results showed no correction of motor, cognitive and sensitive abnormalities observed in Plp null mice with risperidone treatment at 0.3 or 0.6 mg/kg/day. However, the dose of 0.6 mg/kg/day seems to reduce hyperactivity exhibited by Plp null mice observed in different tests, allowing Plp null mice to exhibit a similar profile than untreated WT mice without worsening memory. As hyperactivity is one of the behavioral dysfunction frequently described in SPG2 patient leading to degradation of life quality, it represents an interesting indication for risperidone.

Introduction

The proteolipid protein gene (*PLP1*) which encodes the major proteins of the central nervous system (CNS) myelin sheath, PLP and DM20, is the causative gene of a wide spectrum of X-linked white matter disorders extending from a severe defect in myelin formation, the Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) (Woodward et al., 1998; Boespflug-Tanguy et al., 2008) to a dysmyelinating ascending axonopathy, the spastic paraplegia type 2 (SPG2) (Cailloux et al., 2000; Inoue, 2005). While PMD is mainly caused by duplication of the *PLP1* gene, the SPG2 phenotype is observed in patients lacking PLP/DM20 due to null or truncated mutations. Similarly to other hereditary spastic paraplegia, SPG2 patients exhibit extensive axonal degeneration associated to late appearing myelin decompaction (Garbern et al., 1997, 2002; Sima et al., 2009). In SPG2, the motor milestone of the first year of life is not impaired but the affected boys develop progressive gait abnormalities in the 5 following years. Ataxia with slow progression leads to severe spasticity and loss of ambulation before 12 years of age and is associated with learning disabilities.

A number of spontaneous and genetically engineered mouse mutants carrying mutations in the *Plp1* gene have been described in the last decades and the neuropathological studies of these mice have largely contributed to our understanding of PLP related disorders (Griffiths et al., 1998a; Gruenenfelder et al., 2011). The genetically modified mice in which the *Plp1* gene is inactivated (Plp null mice) have, similarly to SPG2 patients, an age- and length-dependent degeneration of long spinal tracts with axonal swellings of small-diameter axons and show myelin abnormalities in CNS in which oligodendrocytes, in normal number, produce poor quality, less stable and less compacted myelin (Klugmann et al., 1997; Griffiths et al., 1998a, 1998b; Garbern et al., 2002). Previous behavioral studies on Plp null mice have permitted to identify some motor, cognitive and sensitive defects in Plp null mice (Depiets et al., 2012a, 2012b, in preparation). We notably showed that Plp null mice exhibit an early appearing decrease in muscular strength, with few defects in motor coordination. Plp null mice also showed cognitive defects defined as an increased locomotor activity associated with anxiety related disorders and a late decrease in working memory abilities. Finally, we also showed that Plp null mice develop a thermal hyperalgesia as soon as 3 months of age. These alterations are useful markers to assess the efficacy of therapeutic strategies, which are until now, tremendously missing for the treatment of SPG2 symptoms.

Given the implication of numerous neurotransmission systems in cognitive (Millan, 2003; Khan et Muly, 2011; Deiana et al., 2011; Klinkenberg et al., 2011) and sensitive (Julius and Basbaum, 2001; Le Bars and Adam, 2002) functions and the multi-receptorial properties of antipsychotics (APs) (Thomas, 2006; Meltzer and Huang, 2008), we hypothesized that APs could have beneficial effects on behavioral abnormalities caused by the lack of PLP. Furthermore, the positive effect of atypical APs has already

been demonstrated in induced models of myelin defect, like the effect of quetiapine on cuprizone-induced demyelination (Zhang et al., 2008; Xu et al., 2010). Because the quetiapine is not commercialized in France we decide to test a different drug to facilitate the translation to human. Because of its particular properties (Leysen et al., 1988) and the mode of administration in drinking water (which avoid behavioral artifacts due to chronic injections), the risperidone appeared to us to be a good candidate.

In this study, we assessed the effect of atypical APs on the behavioral alterations of Plp null mice including motor, cognitive and sensitive behaviors. Seven months old Plp null and control mice were then treated chronically (2 months) with 2 doses of risperidone: 0.3 or 0.6 mg/kg/day. Behavioral analysis was performed before and, 2 and 6 weeks after, the beginning of the treatment.

1. Materials and methods

1.1. Animals

Male mice with deletion of *Plp1* gene (Plp null) and their wild-type (WT) littermates were generated as previously described (Klugmann et al., 1997). Mice were bred for 15 generations into the C57BL/6N background using mice from the breeding colony of the Max Planck Institute of Experimental Medicine and then transferred to our animal facility (kind gift from Pr K.A. Nave, Gottingen Germany). Genotyping was performed as previously described (Klugmann et al., 1997). Mice were housed eight per cage in a temperature (22 °C) controlled environment under a 12:12 light/dark cycle (light from 7:00 AM. to 7:00 PM.), with *ad libitum* access to food (Harlan pellets, Harlan Gannat, France) and water or treatment in drinking water. Mice were analyzed in longitudinal study from 7 to 9 months of age. Experiments were performed in accordance with French and European Economic Community guidelines for the care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering (86/09/EEC–Council Directive of 24 November 1986).

1.2. Drug and long term treatment

Drug used for long-term treatment in this study was an atypical AP, risperidone (1 mg/mL, Sandoz, Levallois-Perret, France) dissolved in drinking water. We carefully estimated water consumption of WT and Plp null mice groups before the study to determine the quantity of drug necessary to obtain the expected concentrations. Measures indicated that mice at 7 months of age consume approximately 3.85 mL per day. Concentrations of risperidone in the drinking water were calculated to obtain the desired doses, 0.3 and 0.6 mg/kg/day (For a preparation of 500 mL of treatment at the dose of 0.3 mg/kg/day, we diluted 1.34 mL of risperidone 1 mg/mL in 498.66 mL of water, and at the dose of 0.6 mg/kg/day, we

diluted 2.68 mL of risperidone 1 mg/mL in 497.32 mL of water). Bottles containing treatment were protected from light with opaque paper and risperidone was freshly prepared twice a week. When mice reached 7 months of age, they were submitted to a long-term treatment with risperidone or water during a 2-month behavioral testing period.

1.3. Behavioral testing

Drug-free and long-term AP-treated transgenic and WT mice (7 to 9 months old) were investigated during the light phase, in a random order for comparison between genotypes and treatment. Motor evaluations (rotarod, open-field, grip test) were always realized in the morning, while grid test, cognitive evaluations (y-maze, elevated-plus-maze, marble burying test) and sensitive evaluations (tail flick test) were always realized in the afternoon. In all experiments, animals were allowed to habituate to the testing room at least 30 minutes before the test. All devices used for testing were extensively washed with water between two animals to avoid olfactory cues.

The study started at 7 months of age, where all mice have been first subjected to a two weeks-battery of behavioral tests, allowing to assess motor, cognitive and sensitive characteristics before any treatment. The treatment period started immediately at the end of the last day of the behavioral testing. It took place over 2 months, during which the two-week behavioral testing period was realized at 8 and 9 months of age, thus 2 weeks and 6 weeks respectively after the treatment beginning. At 9 months of age, mice were sacrificed by decapitation. Brain and spinal cord were freshly sampled, immersed in nitrogen and conserved at – 80°C for molecular biology analysis.

The global study was divided into two periods; the first experience was to evaluate animals treated with risperidone 0.3 mg/kg/day and drug-free mice. And few weeks later, a second experience was to evaluate animals treated with risperidone 0.6 mg/kg/day and drug-free mice. Results obtained for drug-free mice in both experiences were pooled at 7, 8 and 9 months.

1.3.1. Motor behavior

Locomotor activity: Open-field test

The spontaneous locomotor activity of mice was evaluated in a white polyvinyl chloride open field apparatus (50 cm long x 50 cm wide x 50 cm high) where the tested mice can move freely. Virtual areas, a central square and a peripheral corridor, were determined with video-tracking software (Viewpoint, Lyon, France). During 15 minutes, total distance traveled, time spent and distance traveled in each area of the field were recorded with the video tracking system. Results are expressed as the

total distance traveled and the percentage of distance travelled in central area calculated as distance travelled in central area / total distance travelled in the entire field.

Muscular strength: Grip test

A grip strength meter (Bioseb, Chaville, France) was used to assess hind- or hind- and fore-paws grip strength. Mice were lifted and held by their tail so that their paws could grasp a wire grid. The mice were then gently pulled backward by the tail with their posture parallel to the surface of the table until they released the grid. The grip strength meter digitally displays the maximum force applied as the peaks tension (in newton) once the grasp is released. Each mouse performed five consecutive trials, first with forepaws and then with hind- and fore-paws. The mean value was taken as an index of paws grip strength.

Motor coordination: Rotarod test

Motor coordination was determined using a standard mouse rotarod (TSE, Hombourg, Germany), which provided an accelerating rotational speed. We used the standard operating procedures described by the EUMORPHIA group program (www.eumorphia.org) including training and test phases (Mandillo et al., 2008). *Training phase*: Mice initially underwent a training session on the apparatus, for three consecutive trials, on the rod maintained at constant speed. The rod was kept stationary for the first trial and held at 4 rotations per minute (rpm) for the last two trials. Inter-trial intervals (ITI) were 10 minutes. Mice which were able to stay on the rod at 4 rpm for 60 seconds, were put through the testing phase, with at least 30 minutes interval between the last training trial and the test phase. *Test phase*: Four trials were completed, with a 15 minutes-ITI. In each trial (T1–T4), four mice were placed on the rod rotating at 4 rpm after which the timer was started and the rod accelerated from 4 to 40 rpm for 300 seconds. The latency to fall off the rotarod was determined automatically by a timer that measured to the nearest tenth of second; however, the timer was manually stopped if a mouse held onto the rod completing a full rotation (i.e. “passive rotation”). Results are presented as the mean value of the four trials.

Ataxic behavior: Grid test

Grid test is a test of fine motor coordination allowing detection of ataxic behaviors. Grid test apparatus consist of a field (50 cm long x 50 cm wide x 50 cm high), made of white polyvinyl chloride, containing a wire grid (50 cm long x 50 cm wide x 0.5 cm high) elevated to 25 cm above an infrared floor. The field has one side made of transparent Plexiglas facing a camera detecting vertical movements through the grid (like paw slides) using a videotracking system (Viewpoint, Lyon, France). Another camera overhangs the field and permit to measure the total distance traveled by the animal. Mouse was placed in the center of the grid and number and time of vertical movements were recorded. The session

stopped automatically once the animal has traveled 3 meters or once the cut-off of 300 seconds is achieved. Mice reaching the cut-off were excluded from further analysis. Results are presented as the mean of number of paws slides through the grid during the session.

1.3.2. Cognitive behavior

Working memory: Y-maze

The Y-maze assesses the natural alternating behavior and the exploratory activity of mice. The apparatus was made of three equal arms (40 cm long x 10 cm wide x 16 cm high) made of black polyvinyl chloride. The starting arm and the two arms forming the Y were radiating at an angle of 120° from each other. Without prior habituation to the apparatus, each mouse was placed at the end of one arm, facing the end wall of the arm, and allowed to move freely through the maze during a 10-minute session. The initial arm was alternated within the group of mice to prevent bias of arm placement. Latency to leave the first arm, total number and sequence of entries into each arm were scored for each mouse. An arm entry was counted when the mouse had all four paws inside the arm. Mice that completed less than eight arm entries within 10 min were excluded from further analysis. Y-maze performance was calculated by methods described in current literature. A spontaneous alternation was defined as entries into all three arms on three consecutive choices. The alternation score (%) for each mouse was defined as the ratio of the actual number of alternations to the total possible number of alternations over the testing period: $\% \text{ Alternation} = 100 \times [(\text{Number of alternations}) / (\text{Total arm entries} - 2)]$ and it represents an index of working memory. Total entries were scored as an index of locomotor activity and the latency to exit the starting arm as anxiety-related behavior.

Anxiety: Elevated-plus-maze

The elevated plus maze (EPM) assesses the natural conflict between the tendency of mice to explore a novel environment and the tendency to avoid a brightly lit, elevated, open area (Rodgers and Dalvi, 1997). The EPM comprised two open arms (37 cm long x 6 cm wide) and two closed arms (37 cm long x 6 cm wide x 15 cm high) that extended from a central square platform (6 cm x 6 cm). The apparatus was constructed from Plexiglas (black floor and walls) and elevated to a height of 50 cm above floor level. The mouse was placed on the central platform, facing one of the enclosed arms, and was allowed to explore the maze for 10 minutes. The number of open and closed arm entries and the time spent in different parts of the maze (open and closed arms, central platform) were recorded with a video tracking system (Viewpoint, Lyon, France). The percentage of time spent in open arms was subsequently calculated and represents an index of anxiety state. The number of arms entries is considered as an index of locomotion.

Anxiety: Marble burying test

The procedure for marble burying was adapted with minor modifications from previously described (Millan et al., 2001). Mice were individually placed in transparent polysulfone cages (36 cm long × 21 cm wide × 14 cm high) containing a 4-cm layer of sawdust on which 20 glass marbles (diameter 1.6 cm) are placed and evenly spaced over the cage (five rows of four marbles). Mice freely explored the cage during 30 minutes and the number of marbles buried more than two thirds in the sawdust was scored.

1.3.3. Sensitive behavior

Thermal hyperalgesia: Tail flick test

Level of heat pain sensitivity was evaluated in the tail flick test. The mouse body was maintained in a towel to only let the tail appearing. It consists to submerge the distal part of the mouse tail in warm water at 48°C. Before the test phase, habituation phase (4 trials on 4 consecutive days) was necessary to habituate mice at the contention and the tail immersion in order to avoid stress due to manipulation. Bath water temperature was increased from 46°C at the beginning to 48°C at the end of the test phase to limit tissue lesion. The test phase was realized the day immediately after habituation phase, and consisted in 4 trials in which the latency between immersion and the fast withdrawal of the tail was manually recorded. To avoid tissue lesions, a time cut-off was set at 30 seconds of tail immersion. After each trial the mouse tail was dried with a paper towel and the animal was removed in the home cage for an inter-trial interval (ITI) of 15 minutes. Results are expressed as the mean of the 4 trials in the test phase.

1.4. Statistical analysis

Behavioral data were analyzed using the Statview software (Statview v5.0 for windows, SAS Institute Inc.). An unpaired nonparametric test (the Mann-Whitney test) was used for comparisons between genotypes (Plp null and WT), at each age (7, 8 and 9 months) and for each dose of treatment (drug-free, 0.3 and 0.6 mg/kg/day of risperidone). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

The Kruskal-Wallis analysis of variance was used to compare more than two groups, and allowed to determine the effect of treatment doses for a given age and genotype. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ and a post hoc analysis was then performed using the Bonferroni-Dunn's test, to realize pairwise comparisons between treatment doses for each age and genotype.

2. Results

2.1. Effect of antipsychotic treatment on weight

Considering the weight of Plp null mice and their WT littermates, even if there is a tendency to decrease weight in control Plp null mice compared to controls WT at both 7 and 9 months [$p=0.06$ and $p=0.08$, respectively], a significant decrease in weight is only observed in drug-free Plp null mice at 8 months of age [$p=0.04$]. In APs treated mice, whatever the age and the dose tested, there is no difference between genotypes (**Fig.1**).

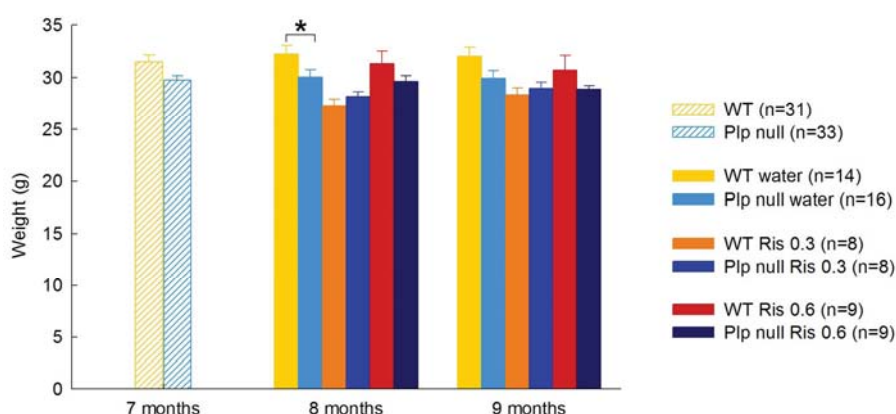


Fig.1. Evaluation of weight of Plp null mice and their WT littermates at 7 months and during antipsychotic treatment at 8- and 9-month-old.

(* $p<0.05$, Mann-Whitney)

2.2. Effect of antipsychotic treatment on motor performances

Locomotor activity: Open-field test

In the open-field test, considering the total distance traveled by Plp null mice and their WT littermates, a significant increase of distance traveled is observed in drug-free Plp null mice at 7, 8 and 9 months of age [$p=0.001$, $p=0.0006$ and $p=0.0005$, respectively]. A significant difference in distance traveled is also observed between Plp null and WT mice treated with risperidone 0.3 mg/kg/day at 9 months of age [$p=0.005$] and with risperidone 0.6 mg/kg/day at both 8 and 9 months of age [$p=0.007$ and $p=0.004$, respectively] (**Fig.2A**).

Considering the total distance traveled, there is a significant effect of treatment in 8- and 9-month-old WT mice [$p=0.0003$ and $p=0.0001$, respectively, Kruskal-Wallis test] and Plp null mice [$p=0.004$ and $p=0.0002$, respectively, Kruskal-Wallis test]. Treatment with risperidone 0.6 mg/kg/day decrease significantly the total distance traveled in 8- and 9-month-old WT mice compared to drug-free WT mice

at same ages [$p=0.0001$ and $p<0.0001$, respectively, Bonferroni-Dunn's post-hoc test], and also in 8- and 9-month-old Plp null mice compared to drug-free Plp null mice at same ages [$p=0.0005$ and $p<0.0001$, respectively, Bonferroni-Dunn's post-hoc test] (**Fig.2A**).

Considering the time spent by Plp null and their WT littermates mice in the open-field central area, a significant increase is observed between drug-free Plp null and WT mice at both 8 and 9 months of age [$p=0.03$ and $p=0.01$, respectively]. A significant difference in time spent in central area is also observed between Plp null and WT mice treated with risperidone 0.3 mg/kg/day at 9 months of age [$p=0.005$] and with risperidone 0.6 mg/kg/day at both 8 and 9 months of age [$p=0.009$ and $p=0.006$, respectively] (**Fig.2B**).

Considering the time spent in central area, there is a significant effect of treatment in 8- and 9-month-old WT mice [$p=0.001$ and $p=0.0007$, respectively, Kruskal-Wallis test] and Plp null mice [$p=0.02$ and $p=0.0008$, respectively, Kruskal-Wallis test]. Treatment with risperidone 0.6 mg/kg/day decrease significantly the time spent in central area in WT mice at 8 and 9 months of age compared to drug-free WT mice at same ages [$p=0.006$ and $p=0.003$, respectively, Bonferroni-Dunn's post-hoc test], and also in 8- and 9-month-old Plp null mice compared to drug-free Plp null mice at same ages [$p=0.005$ and $p=0.004$, respectively, Bonferroni-Dunn's post-hoc test] (**Fig.2B**).

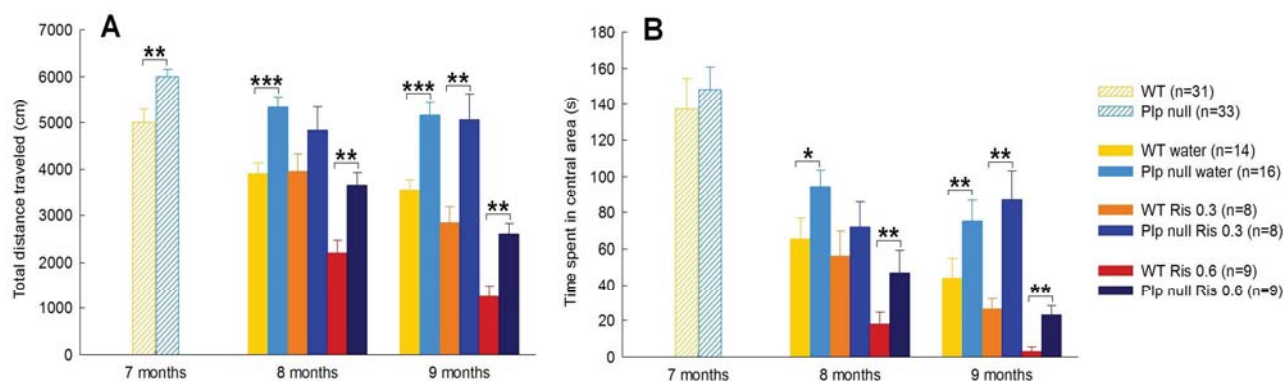


Fig.2. Evaluation of locomotor activity of Plp null mice and their WT littermates in the open-field test at 7 months and during antipsychotic treatment at 8 and 9 months of age.

(A) Total distance traveled by Plp null and WT mice in the open-field.

(B) Time spent in central area by Plp null and WT mice in the open-field.

(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Mann-Whitney)

Muscular strength: Grip test

In the grip test, considering the 2 paws-muscular strength of Plp null mice and their WT littermates, there is a significant decrease in drug-free Plp null mice at 7 months of age [$p=0.01$] and also in Plp null mice treated with risperidone 0.3 mg/kg/day at both 8 and 9 months of age [$p=0.02$ and $p=0.03$, respectively] compared to their respective WT mice (**Fig.3A**).

Considering the 4 paws-muscular strength of Plp null mice and their WT littermates, there is a significant decrease in drug-free Plp null mice compared to WT at 7 months of age [$p=0.04$]. There is also the same significant difference between genotypes in mice treated with risperidone 0.3 mg/kg/day at 8 months of age [$p=0.03$] (**Fig.3B**).

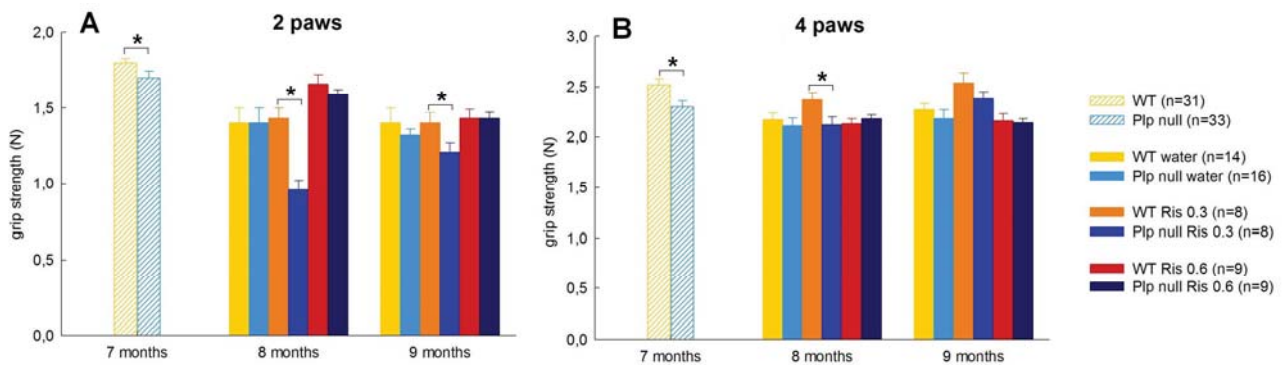


Fig.3. Representation of muscular strength of Plp null mice and their WT littermates, with 2 or 4 paws, in the grip test at 7 months of age and during the antipsychotic treatment at 8 and 9 months of age.

(A) Evaluation of the two forepaws muscular strength of WT and Plp null mice.

(B) Evaluation of the four paws muscular strength of WT and Plp null mice.

(* $P < 0.05$, Mann-Whitney)

Motor coordination: Rotarod test

In the rotarod, considering the latency to fall of Plp null mice and their WT littermates, no significant difference is observed between genotypes whatever the age and the treatment (**Fig.4**).

However, there is a significant effect of treatment on the latency to fall in 8- and 9-month-old WT mice [$p=0.0006$ and $p=0.005$, respectively, Kruskal-Wallis test]. Treatment with risperidone 0.6 mg/kg/day decrease significantly the latency to fall in 8-month-old WT mice [$p=0.007$, Bonferroni-Dunn's post-hoc test] and there is only a tendency to decrease at 9 months of age [$p=0.07$, Bonferroni-Dunn's post-hoc test] compared to drug-free WT mice at same ages. Treatment with the higher dose of risperidone just tends to have an effect in 8- and 9-month-old Plp null mice [$p=0.10$ and $p=0.06$, respectively, Kruskal-Wallis test] (**Fig.4**).

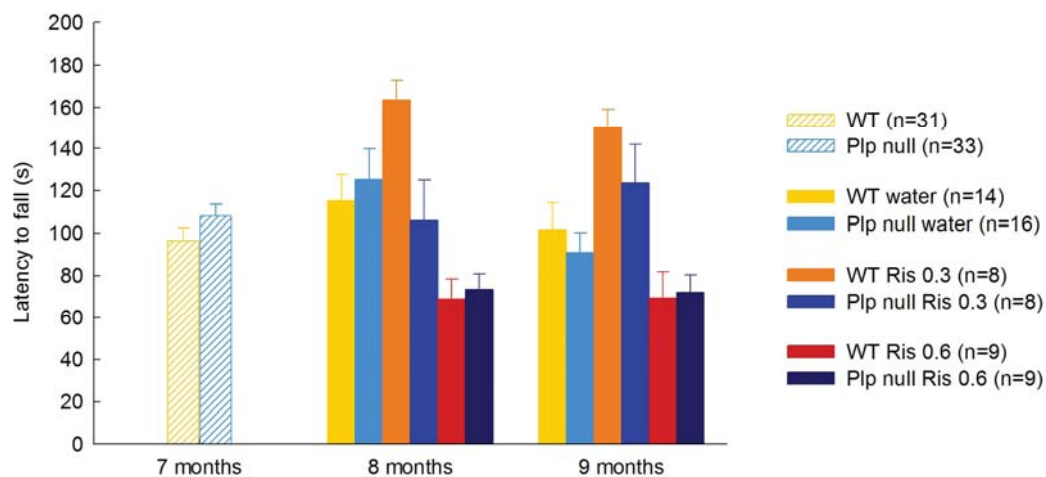


Fig.4. Evaluation of motor coordination of Plp null mice and their WT littermates in the rotarod test at 7 months and during the antipsychotic treatment at 8 and 9 months.

Ataxic behavior: Grid test

In the grid test, considering the number of slides of Plp null mice and their WT littermates, no significant difference is observed between genotypes whatever the age and the treatment (**Fig.5**).

However, the treatment effect tends to decrease the number of slides, in 9-month-old WT mice [$p=0.009$, Kruskal-Wallis test] and in 8- and 9-months-old Plp null mice [$p=0.02$ and $p=0.007$, respectively, Kruskal-Wallis test]. But in both cases, post-hoc analyses don't reveal significant differences whatever the age tested (**Fig.5**).

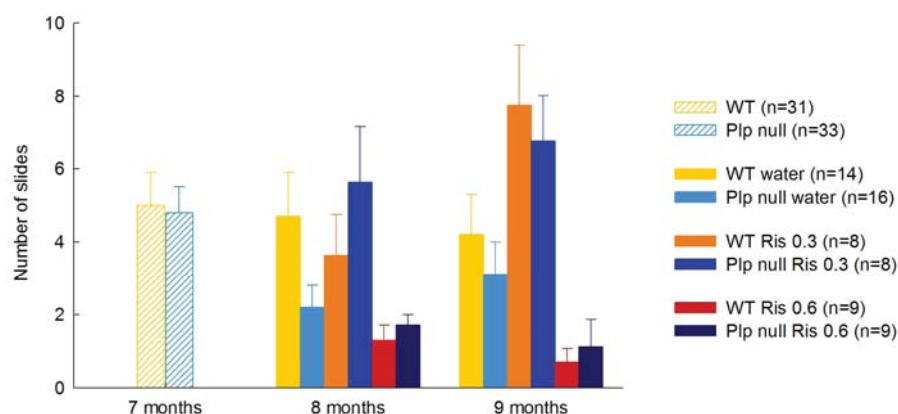


Fig.5 Evaluation of motor coordination of Plp null mice and their WT littermates in the grid test at 7 months and during the antipsychotic treatment at 8 and 9 months.

2.3. Effect of antipsychotic treatment on cognitive performances

Working memory: Y-maze

In the Y-maze, considering the percentage of alternation of Plp null mice and their WT littermates, a significant decrease is observed in Plp null mice compared to WT mice, in drug-free groups at both 7 months and 9 months of age [$p=0.01$ and $p=0.0008$, respectively]. A significant difference between genotypes is also observed in 9-month-old Plp null and WT mice treated with risperidone 0.3 and 0.6 mg/kg/day [$p=0.006$ and $p=0.03$, respectively] (**Fig.6A**).

Considering the number of arm entries, a significant increase is observed in Plp null mice compared to WT mice in the drug-free group at both 7 and 9 months of age [$p=0.02$ and $p=0.03$, respectively]. The same significant difference between genotypes is also observed in 9-month-old Plp null and WT mice treated with risperidone 0.3 and 0.6 mg/kg/day [$p=0.01$ and $p=0.002$, respectively] (**Fig.6B**).

There is also a significant effect of treatment on the number of arm entries in 8- and 9-month-old WT mice [$p=0.02$ and $p=0.002$, respectively, Kruskal-Wallis test] and 8-month-old Plp null mice [$p=0.02$, Kruskal-Wallis test]. Treatment with risperidone 0.6 mg/kg/day decrease significantly the number of arms entries in WT mice at 8 and 9 months of age compared to drug-free WT mice at same ages [$p=0.008$ and $p=0.0002$, Bonferroni-Dunn's post-hoc test] and in Plp null mice at 8 months of age compared to drug-free Plp null mice at same age [$p=0.01$, Bonferroni-Dunn's post-hoc test] (**Fig.6B**).

Considering the latency to leave the first arm of Plp null mice and their WT littermates, a significant increase is only observed in 9 month old Plp null mice treated with risperidone 0.3 mg/kg/day compared to WT mice [$p=0.015$]. For all the other conditions, there is no differences between genotypes (**Fig.6C**).

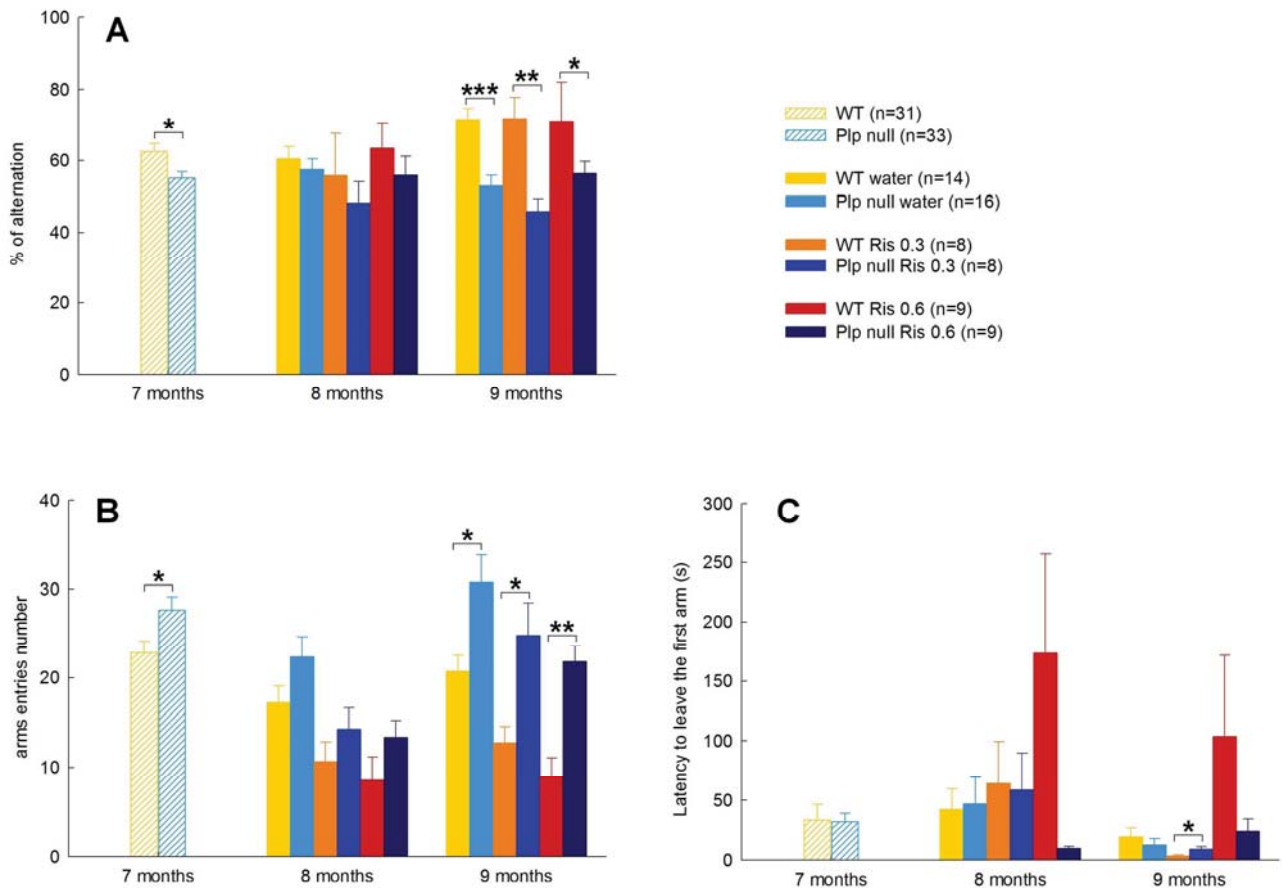


Fig.6. Evaluation of working memory of Plp null mice and their WT littermates in the Y-maze at 7 months and during the antipsychotic treatment at 8 and 9 months of age.

(A) Percentage of alternation of Plp null and WT mice.
 (B) Total arm entries number of Plp null and WT mice.
 (C) Latency to leave the first arm of the maze of Plp null and WT mice.
 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Mann-Whitney)

Anxiety: Elevated-plus-maze

In the EPM, considering the percentage of time spent in the open arms of Plp null mice and their WT littermates, a significant difference is observed between genotypes in drug-free mice at 7 months of age with a severe increase in Plp null mice in the time spent in the open arm [$p < 0.0001$]. The same significant difference is also observed between genotypes in 8-month-old mice treated with risperidone 0.3 mg/kg/day [$p = 0.008$] and in 8- and 9-month-old mice treated with risperidone 0.6 mg/kg/day [$p = 0.02$ and $p = 0.01$, respectively] (**Fig.7A**).

Considering the number of arm entries, even if there is, at all ages tested, a tendency to an increase in drug-free Plp null mice, this increase is statistically significant only at 9 months of age [$p = 0.02$]. The same significant difference is also observed between genotypes in mice treated with risperidone 0.3 mg/kg/day at 8 months of age [$p = 0.03$] and in mice treated with risperidone 0.6 mg/kg/day at 9 months of age [$p = 0.006$] (**Fig.7B**).

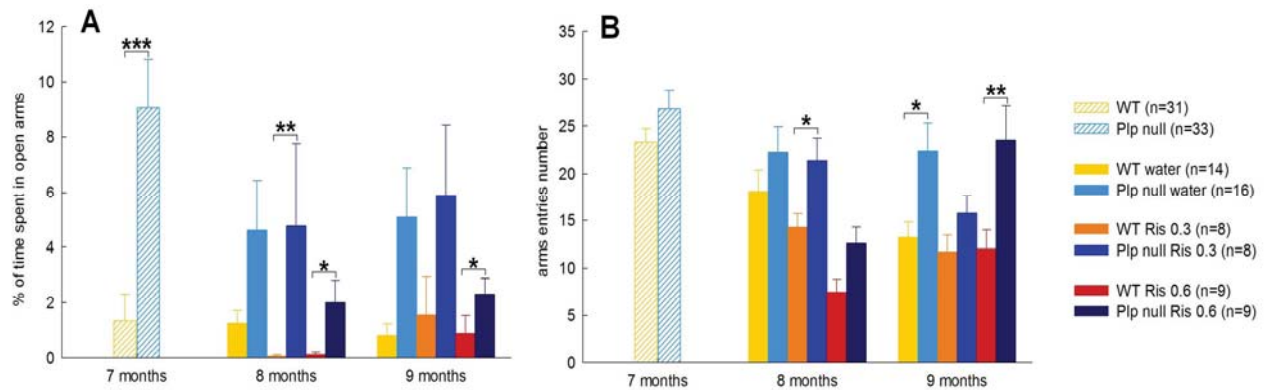


Fig.7. Evaluation of anxiety level of Plp null mice and their WT littermates in the elevated-plus-maze at 7 months and during antipsychotic treatment at 8 and 9 months of age.

(A) Representation of percentage of time spent in the open arms of the maze by Plp null mice and their WT littermates.

(B) Representation of percentage of entries number in the open arms of the maze by Plp null mice and their WT littermates.

(* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, Mann-Whitney)

Anxiety: Marble burying test

In the marble burying test, considering the number of buried marbles by Plp null mice and their WT littermates, even if there is a tendency to decrease in drug-free Plp null compared to WT mice at all ages, a significant decrease is only observed in drug-free Plp null mice at both 8 and 9 months of age [p=0.01 and p=0.005, respectively]. In treated mice, there is no difference between genotype whatever the age tested (Fig.8).

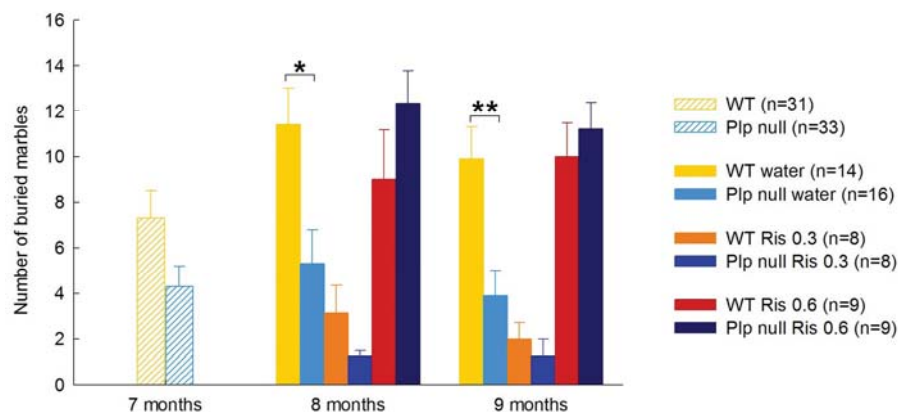


Fig.8. Evaluation of anxiety level of Plp null mice and their WT littermates in the marble burying test at 7 months and during the antipsychotic treatment at 8 and 9 months of age.

(* P<0.05, ** P<0.01, Mann-Whitney)

2.4. Effect of antipsychotic treatment on thermal pain sensitivity

Thermal hyperalgesia: Tail flick test

In the tail flick test, considering the tail flick latency of Plp null mice and their WT littermates, even if there is a tendency to a decrease in drug-free Plp null compared to WT mice at all ages, a significant decrease is only observed at 7 months of age [$p < 0.0001$]. Plp null mice treated with risperidone 0.3 mg/kg/day, at both 8 and 9 months of age, show also a significant decrease in tail flick latencies compared their respective WT mice [$p = 0.0008$ and $p = 0.007$, respectively] while no significant difference is observed between genotypes in mice treated with risperidone 0.6 mg/kg/day at all ages tested (Fig.9).

There is also a significant effect of treatment on tail flick latency, in 8- and 9-month-old WT mice [$p = 0.004$ and $p = 0.005$, respectively, Kruskal-Wallis test] and Plp null mice [$p = 0.0003$ and $p = 0.0007$, respectively, Kruskal-Wallis test]. Treatment with risperidone 0.6 mg/kg/day increase significantly the tail flick latency in WT mice at 8 and 9 months of age compared to drug-free WT mice at same ages [$p = 0.003$ and $p = 0.004$, respectively, Bonferroni-Dunn's post-hoc test], and in Plp null mice at 8 and 9 months of age compared to drug-free Plp null mice at same ages [$p = 0.0002$ and $p = 0.0007$, respectively, Bonferroni-Dunn's post-hoc test] (Fig.9).

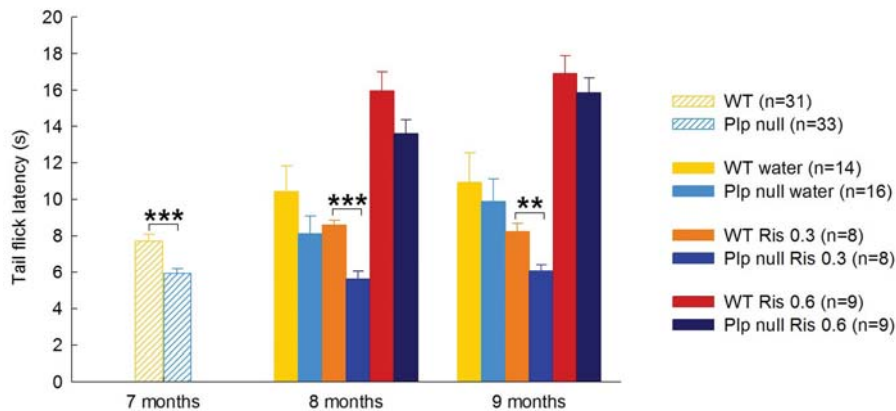


Fig.9. Evaluation of thermal pain sensitivity of Plp null mice and their WT littermates in the tail flick test at 7 months and during antipsychotic treatment at 8 and 9 months of age.

(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Mann-Whitney)

3. Discussion

We have thus performed a behavioral analysis of the effect of two doses of risperidone, namely 0.3 and 0.6 mg/kg/day, on a mouse model of a dysmyelinating disease, the Plp null mice. Our results showed, in accordance with those previously described in our team (Depiets et al., 2012a, 2012b, in preparation), that water-drinking Plp null mice exhibit (1) an increase in locomotor activity associated with an increase in the time spent in the central area of the open field; (2) a decrease in the percentage of alternation associated with an increase in the number of entries in the arms of the Y-maze; (3) an increase in the time spent in the opened arms associated with an increase in the number of entries in the arms of the EPM; (4) a decrease in the number of marbles buried. Considering all these experiments, our study showed that risperidone 0.3 or 0.6 mg/kg/day fail to reduce the difference observed between WT and Plp null mice. An exception could be noted considering the marble burying test where the difference between genotype seems erased by the risperidone treatment. However, the risperidone effects are odd with a decrease in the number of marbles buried for the dose of 0.3 mg/kg/day and an increase for the dose of 0.6 mg/kg/day, and then difficult to interpret. It is also important to note that if the dose of 0.6 mg/kg/day is not able to reduce the difference between genotypes in all behavioral components, it seems to induce a relatively important sedative effect in some tests notably in those implicating locomotion, like the open field or the Y-maze. The sedative action of risperidone has already been described in some studies and has been linked to the high affinity of risperidone for dopaminergic receptors D₂ and for histaminergic receptors H₁ (Cope et al., 2009; Richelson, 2010). Even if the 0.6 mg/kg/day is a relative high dose, its sedative effect is not associated with drowsiness as suggested by the lack of worsening working memory or other motor components like muscular strength, or the lack of body weight gain. Then the effect we have seen in WT and Plp null mice is specific of motor activity without side effect. As hyperactivity is one of the behavioral dysfunction frequently described in SPG2 patient leading to degradation of life quality, it represents an interesting indication for risperidone.

In this study, we also found a lack of difference between genotype in the rotarod test. These results had already been shown by us and others (Griffiths et al., 1998a; Depiets et al., 2012a, in preparation). Because in human, ataxia, spasticity and loss of ambulation are the central symptoms of the disease, we had decided to add to the battery of evaluation a new test assessing ataxic behavior: the grid test. Results showed that water-drinking Plp null mice are also unaffected in the grid test, at least at the ages tested. Consequences of the *Plp1* gene deletion in mice is then definitively different than those observed in human concerning the motor function. This could be explained by the smallest size of mouse (suffering axons are then smaller and then perhaps suffer less), but also very likely by the four

paws position of mice (compared to the standing one of human), which probably allow more opportunity of compensation.

Finally, some results obtained in this study presents real discrepancies with those described before. That's the case for the body weight for whom we used to show a decrease in 9-month-old Plp null mice, for the grip strength for whom we used to show a decrease in Plp null mice as soon as 3 months of age, and finally for the tail flick test for whom we used to show an early onset reduction in the flick latency in Plp null mice. As it is difficult to define if these discrepancies are due to the fact that our study is not well designed or because the phenotype of our mouse model is slightly changing, the interpretation of these results regarding the effect of treatment is strongly difficult if not impossible.

Before we initiated the study, we made the hypothesis that given the implication of numerous neurotransmission systems in cognitive (Millan, 2003; Khan et Muly, 2011; Deiana et al., 2011; Klinkenberg et al., 2011) and sensitive (Julius and Basbaum, 2001; Le Bars and Adam, 2002) functions and the multi-receptorial properties of antipsychotics (APs) (Thomas, 2006; Meltzer and Huang, 2008), APs could have beneficial effects on behavioral abnormalities caused by the lack of PLP.

Some recent studies have shown in models with alterations of white matter induced by cuprizone, a copper chelator, that demyelination occurs concomitantly with the increase in dopaminergic levels in some brain regions such as prefrontal cortex, resulting in abnormal behaviors, and with oxidative stress, fatal for oligodendrocytes (Xu et al., 2009). The loss of myelin sheath integrity not only affects the communication between the different brain areas but also impairs the coordination and balance of different neurotransmitter systems in the brain (Zhang et al., 2008; Xu et al., 2010), resulting in modification of global behavior, particularly the cognitive component. These authors also showed that haloperidol (a classical AP) or atypical APs, quetiapine and clozapine, had a positive effect on behavioral and neurobiological consequences of cuprizone-induced demyelination. Zhang *et al.* demonstrated that five-week quetiapine treatment (10 mg/kg, in drinking water) prevented or alleviated pathological changes, i.e. myelin breakdown, demyelination, decrease of myelin basic protein expression in the cerebral cortex, microglial activation and astrocytic proliferation, induced by cuprizone administration. In a same mouse model of cuprizone, Xu *et al.* showed that daily administration of APs (quetiapine 10 mg/kg/day, clozapine 10 mg/kg/day or haloperidol 1mg/kg/day; intraperitoneally; during 42 days) prevents deficits in the prepulse inhibition of acoustic startle response and the higher dopamine concentration in the prefrontal cortex, prevent the decrease in spontaneous alternation in the Y-maze and prevent, except haloperidol, deficits in social interactions. They showed also that clozapine administration attenuate the white matter damages, due to cuprizone, in the prefrontal cortex and also in

the caudate putamen and hippocampus, proving the protective effect of APs on white matter injury in this model.

Therefore, we hypothesized that the dysmyelination occurring in Plp null mice leads to similar biological mechanisms and decided to assess the efficacy of APs on our model. We privileged atypical APs because of their particular properties, with low affinity for dopaminergic receptors, but a better affinity for some serotonergic, adrenergic and histaminergic receptors compared to classic APs, like haloperidol, that has essentially dopaminergic and α_2 adrenergic properties (Miyamoto et al., 2005). Among the atypical APs, although quetiapine and clozapine demonstrated beneficial effects in mouse models, in the viewpoint of a translation to human, these two drugs bring a restricted interest. In fact, clozapine show various deleterious side effects and is then particularly few prescribed, and quetiapine is not commercialized in many countries, notably in France. Conversely, risperidone appeared to us to be a good candidate because it is widely used and well tolerated in human. Furthermore, risperidone share many molecular properties with quetiapine, like great affinity for dopaminergic receptors D_2 and for serotonergic 5-HT_{2A} and adrenergic α_1 receptors (Leysen et al., 1988; Miyamoto et al., 2005). Moreover, for experimentation in mice, the mode of administration of risperidone in drinking water represents a substantial advantage, since it avoid stress due to chronic injection. A study in a mice model of schizophrenia showed that risperidone long-term treatment administrated in drinking water (0.3mg/kg/day, during 8 weeks) strongly improved sociability whereas typical AP were less active, and fixed abnormal anxious behavior, but impaired to improve working memory (Delotterie et al., 2010). Finally, some patients with SPG2 had already been treated with risperidone and efficiency has been showed in some cases (clinical information, Boesplug-Tanguy O).

Even if sedative effect of high dose risperidone allows to recover in Plp null mice a similar profile to untreated WT mice in some motor components without worsening others cognitive components, this atypical antipsychotic treatment fails to correct all the behavioral defects observed in our model. A first perspective of this study will be to investigate the neurobiological changes in Plp null mice treated with this AP. In fact, it could be possible that biological changes induced by AP treatment appeared, but were not sufficient to reverse abnormal behaviors. To assess this hypothesis it will be interesting to determine, in the samples we have obtained at the end of the protocol, the expression of some biomarkers known to be deregulated in Plp null mice brain and spinal cord.

The second perspective is of course to assess the efficacy of other drugs, notably on the behaviors we failed to correct in this study. We can first evaluate if others atypical APs with similar properties could have beneficial effects on behavioral defects of Plp null mice. It would also be interesting to assess efficacy of some selective serotonin reuptake inhibitors, like fluoxetine. This drug has already

demonstrated a possible neuroprotective effect in multiple sclerosis, which is an acquired demyelinating disease marked by neurons and astrocyte proliferation and astrocytic glycogenolysis stimulation with increase in energy source for axons (Patti et al., 2010). But concerning the pain aspect in our model, fluoxetine seems to present limitations and besides some side effects, its efficacy in pain syndromes is relatively poor. In human, in case of neuropathic pain, the first line treatment seems to be tricyclic antidepressants, like clomipramine or imipramine, that prevent recapture of various neurotransmitters as serotonin and norepinephrine, both of which influence descending pain pathways, and then in second line, antiepileptic, like gabapentin that are thought to limit neuronal excitation and enhance inhibition (Maizels and McCarberg, 2005; Sindrup et al., 2005).

Finally, in multiple sclerosis it is also hypothesized that cholinergic deficit might derive from disruption of cholinergic pathways and impaired axonal transport of acetylcholine due to demyelination and axonal transection. Strikingly, acetylcholinesterase (the degradation enzyme of acetylcholine) inhibitors currently used in Alzheimer disease, like donepezil, have demonstrated some efficiency on cognitive defects, particularly executive functions, new learning and memory, developed by multiple sclerosis patients (Krupp et al., 2004; Patti et al., 2010). This drug represents then a putative therapeutic hope for SPG2 patients.

Increased knowledge on the disease pathophysiology, thanks to our dysmyelinating mouse model, is thus a particularly important aspect that will help us to bring new precise elements to determine the more appropriate medication for SPG2 patients and to establish a well-designed study confirming a therapeutic effect.

References

- Le Bars D and Adam F. Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain. *Ann Fr Anesth Reanim* 2002; 21:315-335.
- Boespflug-Tanguy Odile, Labauge P, Fogli A, Vaurs-Barriere C. Genes involved in leukodystrophies: a glance at glial functions. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2008; 8: 217-229.
- Cailloux F, Gauthier-Barichard F, Mimault C, Isabelle V, Courtois V, Giraud G, et al. Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. Clinical European Network on Brain Demyelinating Disease. *Eur. J. Hum. Genet* 2000; 8: 837-845.
- Cope MB, Li Xingsheng, Jumbo-Lucioni P, DiCostanzo CA, Jamison WG, Kesterson RA, et al. Risperidone alters food intake, core body temperature, and locomotor activity in mice. *Physiology & Behavior* 2009; 96: 457-463.
- Deiana S, Platt B, Riedel G. The cholinergic system and spatial learning. *Behavioural Brain Research* 2011; 221: 389-411.
- Delotterie D, Ruiz G, Brocard J, Schweitzer A, Roucard C, Roche Y, et al. Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 2010; 208: 131-141.
- Depiets B, Giraudet F, Avan P, Vaurs-Barriere C, Bechon C, Gonthier-Gueret C, Boespflug-Tanguy O, Begou M (2012a) Motor but also cognitive defects in mice deleted for the major myelin protein.
- Depiets B, Giraudet F, Bechon C, Bardin L, Avan P, Boespflug-Tanguy O, Begou M (2012b) Lack of the major myelin protein causes central sensitization of thermal painful stimuli.
- Garbern J Y, Cambi F, Tang XM, Sima AA, Vallat JM, Bosch EP, et al. Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin. *Neuron* 1997; 19: 205-218.
- Garbern James Y, Yool DA, Moore GJ, Wilds IB, Faulk MW, Klugmann Matthias, et al. Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain* 2002; 125: 551-561.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Thomson C, Vouyiouklis D, Nave KA. Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microsc. Res. Tech* 1998a; 41: 344-358.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 1998b; 280:1610-1613.
- Gruenenfelder FI, Thomson G, Penderis J, Edgar JM. Axon-glial interaction in the CNS: what we have learned from mouse models of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J. Anat* 2011; 219: 33-43.
- Inoue K. PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* 2005; 6: 1-16.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413: 203-210.
- Khan ZU, Muly EC. Molecular mechanisms of working memory. *Behavioural Brain Research* 2011; 219: 329-341.
- Klinkenberg I, Sambeth A, Blokland A. Acetylcholine and attention. *Behavioural Brain Research* 2011; 221: 430-442.
- Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths I R, et al. Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 1997; 18: 59-70.
- Krupp LB, Christodoulou C, Melville P, Scherl WF, MacAllister WS, Elkins LE. Donepezil improved memory in multiple sclerosis in a randomized clinical trial. *Neurology* 2004; 63: 1579-1585.
- Leysen JE, Gommeren W, Eens A, de Chaffoy de Courcelles D, Stoof JC, Janssen PA. Biochemical profile of risperidone, a new antipsychotic. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1988; 247: 661 -670.
- Maizels M, McCarberg B (2005) Antidepressants and antiepileptic drugs for chronic non-cancer pain. *Am Fam Physician* 71:483-490.
- Mandillo S, Tucci V, Hölter SM, Meziane H, Banchaabouchi MA, Kallnik M, et al. Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol. Genomics* 2008; 34: 243-255.
- Meltzer HY, Huang M. In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems. In *Serotonin and Dopamine Interaction: Experimental Evidence and Therapeutic Relevance* Elsevier 2008; p. 177-197.
- Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology* 2003; 70: 83-244.

- Millan MJ, Dekeyne A, Papp M, La Rochelle CD, MacSweeney C, Peglion JL, et al. S33005, a novel ligand at both serotonin and norepinephrine transporters: II. Behavioral profile in comparison with venlafaxine, reboxetine, citalopram, and clomipramine. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 2001; 298: 581-591.
- Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol. Psychiatry* 2005; 10: 79-104.
- Patti F, Leone C, D'Amico E. Treatment options of cognitive impairment in multiple sclerosis. *Neurol. Sci.* 2010; 31: S265-269.
- Richelson E. New antipsychotic drugs: how do their receptor-binding profiles compare? *J Clin Psychiatry* 2010; 71: 1243-1244.
- Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 801-810.
- Sima AAF, Pierson CR, Woltjer RL, Hobson GM, Golden JA, Kupsky WJ, et al. Neuronal loss in Pelizaeus–Merzbacher disease differs in various mutations of the proteolipid protein 1. *Acta Neuropathologica* 2009; 118: 531-539.
- Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS (2005) Antidepressants in the Treatment of Neuropathic Pain. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 96:399–409.
- Thomas EA. Molecular profiling of antipsychotic drug function: convergent mechanisms in the pathology and treatment of psychiatric disorders. *Mol. Neurobiol.* 2006; 34: 109-128.
- Woodward K, Kendall E, Vetrie D, Malcolm S. Pelizaeus-Merzbacher disease: identification of Xq22 proteolipid-protein duplications and characterization of breakpoints by interphase FISH. *Am. J. Hum. Genet* 1998; 63: 207-217.
- Xu H, Yang H-J, McConomy B, Browning R, Li X-M. Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mouse exposed to cuprizone: effects of antipsychotics. *Front Behav Neurosci* 2010; 4: 8.
- Xu H, Yang H-J, Zhang Y, Clough R, Browning R, Li X-M. Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mice exposed to cuprizone. *Behav. Neurosci* 2009; 123: 418-429.
- Zhang Y, Xu H, Jiang W, Xiao L, Yan B, He J, et al. Quetiapine alleviates the cuprizone-induced white matter pathology in the brain of C57BL/6 mouse. *Schizophr. Res* 2008; 106: 182-191.

Article 4

“Cognitive and sensitive abnormalities in heterozygous female mice lacking PLP, the major myelin protein of central nervous system”

Article 4. “Cognitive and sensitive abnormalities in heterozygous female mice lacking PLP, the major myelin protein of central nervous system”

I. Présentation et méthodologie

Les modèles murins de leucodystrophies dysmyélinisantes ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur ces pathologies au cours de ces dernières années. Si jusqu'à aujourd'hui l'intérêt s'est particulièrement porté sur les souris mâles homozygotes surexprimant *Plp1* et hémizygotés invalidées pour *Plp1*, respectivement modèle de PMD et de SPG2, peu de données concernent les souris femelles hétérozygotes, modèles des mères transmettrices de ces pathologies. Pourtant, il a déjà été rapporté dans la littérature clinique que des femmes hétérozygotes manifestaient à l'âge adulte des symptômes de SPG2 associés à une démence progressive avec une atrophie corticale (Nance et al., 1996). Selon ces observations cliniques, il est apparu que les mères hétérozygotes pour des mutations de *PLP1*, causant un phénotype sévère chez leurs garçons, seraient asymptomatiques tandis que celles portant des mutations à l'origine de phénotypes plus modérés chez leurs garçons tendraient à manifester des symptômes, tels que des anomalies de la mémoire épisodique, une hyperactivité et/ou un déficit d'attention, du langage, de la réalisation de mouvements ou des capacités exécutives.

Nous avons donc mis en place sur nos modèles souris femelles hétérozygotes invalidées pour le gène *Plp1* (*Plp* null) ou surexprimant *Plp1*, respectivement modèles des mères transmettrices de SPG2 ou PMD, une étude longitudinale afin d'identifier les éventuelles anomalies motrices, cognitives et sensibles liées à leurs génotypes. Pour cela les animaux ont été évalués tous les 3 mois de l'âge de 3 à 15 mois sur des tests moteurs (rotarod, open-field, test d'agrippement), cognitifs (test de reconnaissance d'objets, labyrinthe en Y, test de sociabilité et reconnaissance sociale, labyrinthe en croix surélevé, test d'enfouissement de billes de verre) et sensitifs (test d'immersion de la queue, test de préférence de place thermique).

II. Résultats et discussion

Les résultats de l'analyse comportementale sur les modèles souris de mères transmettrices de PMD et SPG2, ont permis d'identifier des anomalies comportementales chez les souris porteuses de délétion du gène *Plp1*, tandis que celles porteuses d'une surexpression semblent asymptomatiques.

En effet, nous avons mis tout d'abord en évidence une masse corporelle réduite chez les souris *Plp* null hétérozygotes âgées de 12 mois comparées aux souris sauvages. D'un point de vue moteur, que ce soit concernant la coordination motrice ou la force musculaire, les souris des deux génotypes ne présentent pas de différence avec les souris contrôles. Cependant,

contrairement aux souris surexprimant *Plp1*, les souris Plp null hétérozygotes développent une hyperactivité motrice dès l'âge de 6 mois. Sur le plan cognitif, les deux génotypes ne développent pas d'altération de la mémoire épisodique à court ou long terme, ni d'anomalie du comportement social, mais les souris Plp null hétérozygotes présentent un fort déficit de la mémoire de travail dès l'âge de 6 mois, ainsi que des anomalies du comportement anxieux dès l'âge de 9 mois. Enfin, d'un point de vue sensitif, il semble que les souris femelles Plp null développent une légère hyperalgésie thermique au chaud, surtout marquée à 6 et 15 mois, mais sans anomalies du comportement allodynique.

Au vu de ces données, il apparaît donc que les souris Plp null hétérozygotes, modèles de mères transmettrices de SPG2, seraient symptomatiques, contrairement aux souris hétérozygotes surexprimant *Plp1*, modèles de mères transmettrices de PMD. Ces résultats sont en totale cohérence avec certains travaux cliniques ayant déjà mis en évidence l'apparition de symptômes cognitifs chez des mères de patients SPG2, mais pas de patients PMD sévères (Hodes et al., 1995, 1997; Nance et al., 1996; Inoue et al., 2001; Marble et al., 2007; Yiu et al., 2009). Il est intéressant de noter que notre modèle Plp null hétérozygote présente le même type de symptômes que les femmes hétérozygotes porteuses de délétion de *PLP1*, notamment des troubles liés au stress et à l'anxiété, ainsi que des altérations de la mémoire de travail et une hyperactivité (données personnelles, Pr. Boespflug-Tanguy).

D'autre part, on peut noter que même si les souris hétérozygotes Plp null présentent des anomalies comportementales, il s'agit d'une pathologie bien distincte de celle développée par les mâles hémizygotés Plp null, décrits notamment avec d'importantes altérations de la force musculaire et des déficits de mémoire de travail moins marqués.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'apparition de symptômes chez les femelles hétérozygotes ; premièrement, une modification de l'expression des gènes liée à l'âge, qui peut être vérifiée chez les souris par des quantifications en qRT-PCR au cours du développement et du vieillissement.

Il y a quelques années, Inoue a proposé une autre hypothèse selon laquelle les mères porteuses de mutations de *PLP1* présenteraient des phénotypes liés à la sévérité de la mutation qu'elles portent (Inoue et al., 2001) et que certaines mères porteuses de mutations nulles ou ponctuelles responsables de formes modérées de PMD/SPG2 développeraient des leucodystrophies dégénératives d'apparition tardive (Raskind et al., 1991; Hodes et al., 1995, 1997). Ce phénomène pourrait s'expliquer par la normalisation ou non de la population d'OLs. Suite au phénomène d'inactivation aléatoire du chromosome X, les femmes hétérozygotes possèdent deux populations de précurseurs d'OLs, l'une exprimant l'allèle *PLP1* normal et l'autre seulement l'allèle *PLP1* mutant. Des mutations sévères de *PLP1*

mèneraient à une anomalie de différenciation des OLs et à un phénomène d'apoptose. Ainsi, seuls les OLs exprimant l'allèle *PLP1* normal survivraient dans la myéline mature. Dans le cas de mutations de *PLP1* à l'origine de phénotypes modérés, les OLs mutants survivent pendant le développement et participent à la formation de la gaine de myéline, formant ainsi un mosaïcisme. Ce phénomène de mosaïque a été identifié dans le modèle souris présentant une invalidation de *Plp1* (Klugmann et al., 1997; Griffiths et al., 1998b). Mais cette myéline « mutante » est instable et se dégrade par la suite, expliquant les manifestations cliniques d'apparition tardive qui peuvent survenir chez ces mères transmettrices. Cette hypothèse est également soutenue par des études menées sur d'autres mutants *Plp1*, notamment la souris *jimpy*, modèle de forme sévère de PMD (Bartlett et Skoff, 1986, 1989), et la souris hétérozygote *rumpshaker*, modèle de SPG2 (Fanarraga et al., 1991).

Il est important de préciser que si les souris *Plp* null hétérozygotes constituent le modèle génétique parfait des mères transmettrices (invalidation du gène *Plp1* sur un seul chromosome X), les souris hétérozygotes surexprimant *Plp1*, du fait de leur construction, sont un peu moins pertinentes. En effet, la surexpression de *Plp1* a été réalisée à l'aide d'un transgène qui s'est intégré en tandem, mais pas au niveau du chromosome X. Ainsi les souris sur-expriment moitié moins de copies de *Plp1*, mais ceci quelles que soient les cellules ; il n'y a pas de phénomène d'inactivation du chromosome X. Le phénotype développé par ces souris est alors peut-être moins proche de la clinique humaine que pour les femelles hétérozygotes *Plp* null.

Sur le plan physiopathologique, les anomalies comportementales observées dans ces modèles pourraient également s'expliquer par une altération des interactions axone/glie. Nave a récemment fait l'hypothèse que les fonctions cognitives seraient sensibles aux altérations des OLs (Nave, 2010) (**Figure 45**). Il s'agit d'un modèle hypothétique mettant en évidence les conséquences possibles d'une faible myélinisation, d'une altération des diamètres axonaux, et/ou du transport axonal, causés par un dysfonctionnement des OLs. Lorsque les projections corticales au travers du corps calleux sont myélinisées, elles peuvent établir et maintenir des oscillations correctes entre les sous-unités corticales. La plasticité synaptique à modulation temporelle relative (changement de la force synaptique basé sur l'ordre des décharges pré- et post-synaptiques) nécessite une précision de quelques millisecondes qui est dépendante de cette myélinisation. Il est possible qu'un transport axonal perturbé puisse altérer la composition en protéines des terminaisons pré-synaptiques. Dans le cadre de perturbations oligodendrocytaires plus sévères, pouvant être induites dans un contexte d'inflammation et de démyélinisation, celles-ci entraîneraient des anomalies axonales, telles qu'un blocage des conductions et/ou une perte axonale définitive perturbant les connectivités. Une faible

myélinisation intracorticale peut également mener à une anomalie de la croissance axonale et/ou interférer avec la consolidation de la mémoire.

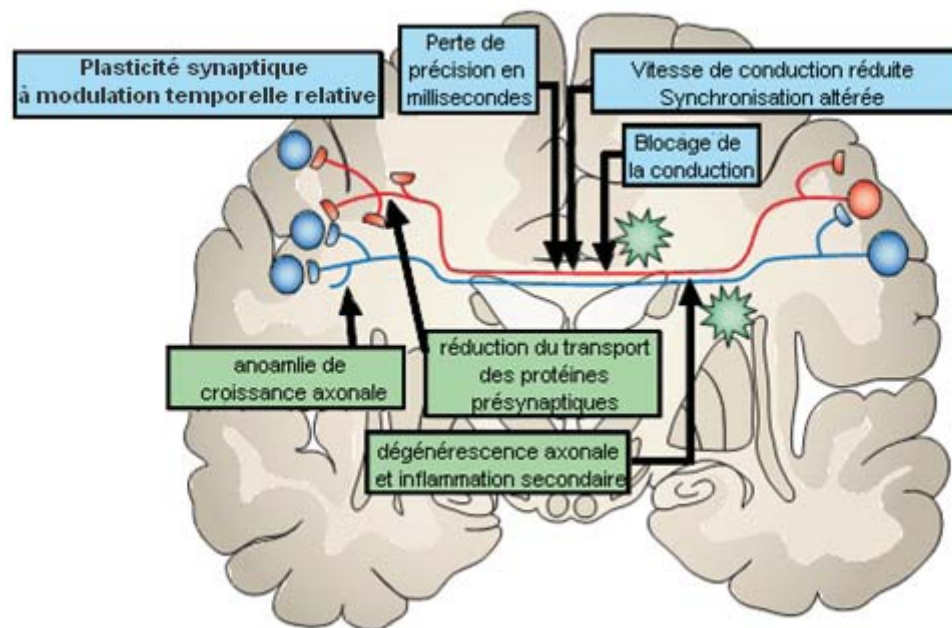


Figure 45. Des dysfonctionnements oligodendrocytaires peuvent mener à des altérations cognitives.

Les cadres bleus présentent les conséquences possibles d'une myélinisation réduite, une altération des diamètres axonaux, et/ou du transport axonal, induites par un dysfonctionnement oligodendrocytaire.

Les cadres verts présentent, lors de perturbations oligodendrocytaire plus sévères, les altérations intervenant dans un contexte d'inflammation (étoiles vertes) et de démyélinisation, qui entraînent des anomalies axonales telles qu'un blocage des conductions et/ou une perte axonale irréversible perturbant les connectivités. (D'après, Nave, 2010)

III. Conclusion et perspectives

Si aujourd'hui encore peu d'études ont été réalisées sur les mères transmettrices de PLP-pathies ou sur leurs modèles animaux, il apparaît que ces mères porteuses de mutations de *PLP1* peuvent présenter des symptômes de sévérité plus ou moins étendue selon la nature de la mutation qu'elles portent. A ce jour, il y a encore beaucoup à apprendre sur les mécanismes biologiques menant aux altérations physiologiques et comportementales observées chez ces mères. Les modèles animaux sont des outils précieux pour améliorer cette compréhension et permettre d'envisager des traitements.

En ce qui concerne notre modèle souris de mères transmettrices de SPG2, il serait intéressant de réaliser des études de biologie moléculaire et d'immunohistochimie, sur le cerveau et la moelle épinière, afin de déterminer les substrats biologiques responsables des anomalies comportementales observées chez ces souris.

D'autre part, dans une même réflexion que pour les modèles souris mâles *Plp* null, il serait également intéressant d'analyser l'impact d'un traitement antipsychotique ou antidépresseur sur les altérations comportementales des souris femelles hétérozygotes *Plp* null.

IV. Article

Cognitive and sensitive abnormalities in heterozygous female mice lacking PLP, the major myelin protein of central nervous system

DEPIETS Bérengère ^{1,3}, BECHON Céline ^{1,3}, VAURS-BARRIERE Catherine ^{1,4}, BOESPFLUG-TANGUY Odile ^{1,2}, BEGOU Mélina ^{1,3}

¹ University of Clermont-Ferrand, Medical faculty, Clermont-Ferrand, France

² CHU Robert Debré, reference center for "leukodystrophies", Paris, France

³ INSERM U676, Hôpital Robert Debré, Paris, France

⁴ GReD, INSERM U1103, University of Clermont-Ferrand, Medical faculty, France

Abstract

Mutations in the proteolipoprotein (*PLP1*) gene cause a spectrum of X-linked developmental and neurodegenerative disorders from most severe form, the Pelizaeus-Merzbacher Disease (PMD) due to gene duplications, to mild form, the type 2 spastic paraplegia (SPG2) due to null mutations. PMD male patients are characterized by early impairments of motor development with neurological signs, while in SPG2 patients the motor milestones of the first year of life is not impaired but they develop ataxia and spasticity with age. During long time, it has been considered that dysmyelination induced by *PLP1* gene mutations are recessive diseases affecting only hemizygous males. However, according to clinical observations, it appeared that heterozygous mothers develop symptoms linked to the severity of the mutation carried. To further investigate the cognitive and behavioral abnormalities related to *PLP1* null expression or overexpression in heterozygous females, we initiated a longitudinal study in mice models of heterozygous carrier mothers and compared their phenotypes with clinical observations. The pattern and temporal evolution of motor, cognitive and sensitive behaviors have been assessed. We reported that heterozygous Plp null mice exhibit cognitive abnormalities, in particular in working memory, anxiety-related behaviors and hyperlocomotion, while Plp overexpressing heterozygous mice have no significant behavioral alteration. We have thus identified a link between the severity of symptoms developed by heterozygous females and the severity of the mutation carried. These results are fully consistent with clinical observations highlighting, in mild SPG2 patient's mothers, some cognitive impairment, like hyperactivity or working memory defects, while severe PMD patient's mothers exhibit no behavioral abnormalities. Neuropathological studies have now to be performed to understand the underlying substrate of these behavioral abnormalities.

1. Introduction

Mutations in the proteolipoprotein gene (*PLP1*) cause in human a spectrum of X-linked developmental and neurodegenerative disorders from most severe form, the Pelizaeus-Merzbacher Disease (PMD), to less severe ones, the type 2 spastic paraplegia (SPG2) (Cailloux et al., 2000; Inoue, 2005). It appears that duplications of the *PLP1* gene are predominantly found in PMD and null mutations in SPG2, indicating a genotype-phenotype correlation (Cailloux et al 2000). In male patients, PMD is characterized by an early impairment of motor development (<6 months of life) with neurological signs that is gradually modified by the maturing nervous system (nystagmus, choreoathetotic movements, ataxia and progressive spasticity). In SPG2 the motor milestones of the first year of life is not impaired but the affected boys develop progressive gait abnormalities in the 5 following years. Ataxia slow progression leading to severe spasticity and loss of ambulation over about 10 years are associated with learning disabilities.

During a long time, it has been considered that dysmyelinations induced by *PLP1* gene mutations were recessive diseases in which only hemizygous males were affected. However, according to clinical observations, if it appears that heterozygote mothers for *PLP1* mutations causing severe phenotype in their son are usually asymptomatic, it is not the case for those carrying mutations responsible for mild phenotype. In fact, some carrier females with *PLP1* missense or nonsense mutations, leading to mild PMD or SPG2 phenotype in their child, has already been described with clear alterations in their instrumental (language and apraxia) and executive capacities or their episodic memory (Raskind et al., 1991; Nance et al., 1996; Hodes et al., 1997; Garbern et al., 1997). Some other mothers seem normal except for tendency to mild alteration in categorized fluency and hyperactivity/attention deficit (Inoue, 2005). Finally, it has also been reported in human heterozygous females who manifest adult onset forms of SPG2, a progressive dementia with cortical atrophy (Nance et al., 1996).

A number of spontaneous and genetically engineered mouse mutants carrying mutations in the *Plp1* gene have been characterized phenotypically: (1) The *Plp* overexpressing mice, which exhibit 14 *Plp1* extra copies at the homozygous status express a myelin defect associated with early motor disturbance and die before three months of age (Readhead et al., 1994; Anderson et al., 1998) mimicking clinical features of PMD classical forms; (2) the *Plp* null mice with *Plp1* gene invalidation, demonstrate a late and mild motor phenotype associated with normal lifespan and develop a late length dependant axonopathy with dysmyelination mimicking the clinical features of the SPG2 (Klugmann et al., 1997; Griffiths et al., 1998a). If *Plp* overexpressing homozygous and *Plp* null hemizygous males have been

carefully studied, little is known about heterozygous females which model human carrier mothers of PMD and SPG2 respectively.

In this study we then performed a longitudinal behavioural study on mouse models of PMD and SPG2 carrier mothers in order to assess if heterozygous female are asymptomatic or develop their own symptoms related or not to genotype. The pattern and temporal evolution of motor, cognitive and sensitive behaviours have been assessed each 3 months, in 3- to 15-month-old carrier mothers.

1.1. Behavioural testing

1.1.1. General

Distinct cohorts of transgenic and WT mice were used to assess, in one hand cognitive and motor performances, and in other hand sensitive behaviours. In all tests, for each genotype, 18 mice were evaluated in a longitudinal study, every 3 months, from 3- to 15-month-old, except for testing of allodynia where 14 mice were evaluated for each genotype. Behavioural tests were realized during the light phase, in a random order for comparison between genotypes. Motor evaluations (rotarod, open-field, grip test) were realized in the morning, while cognitive evaluations (y-maze, elevated-plus-maze, marble burying test) and sensitive evaluations (tail flick test, thermal place preference test) were realized in the afternoon. In all experiments, animals were allowed to habituate to the testing room 30 minutes before the test. All devices used for testing were extensively washed with water between animals to avoid olfactory cues. General aspect of mice was carefully observed during each test and body weight was measured at the end of experiments.

1.1.2. Motor coordination: Rotarod test

Motor coordination was determined using a standard mouse rotarod (TSE, Hombourg Germany), which provided an accelerating rotational speed. We used the standard operating procedures described by the EUMORPHIA group program (www.eumorphia.org) including training and a test phases; (Mandillo et al., 2008). *Training phase*: Mice initially underwent a training session on the apparatus, for three consecutive trials, when the rod was maintained at constant speed. The rod was kept stationary for the first trial and held at 4 rotations per minutes (rpm) for the last two trials. Inter-trial intervals (ITI) were 10 minutes. Mice which were able to stay on the rod at 4 rpm for 60 seconds, were put through the testing phase, with at least 30 minutes interval between the last training trial and the test phase. *Test phase*: Four trials were completed, with a 15 minutes-ITI. In each trial (T1–T4), mice were placed on the rod rotating at 4 rpm after which the timer was started and the rod accelerated from 4 to 40 rpm for 300 seconds.

The latency to fall off the rod was determined automatically by a timer that measured to the nearest tenth of a second; however, the timer was manually stopped if a mouse held onto the rod completing a full rotation (i.e. “passive rotation”).

1.1.3. Muscular strength: Grip test

A grip strength meter (Bioseb, Chaville, France) was used to assess hind- or hind- and fore-paws grip strength. Mice were lifted and held by their tail so that their paws could grasp a wire grid. The mice were then gently pulled backward by the tail with their posture parallel to the surface of the table until they released the grid. The grip strength meter digitally displays the maximum force applied as the peaks tension (in newton) once the grasp is released. Each mouse performed five consecutive trials, first with forepaws and then with hind- and fore-paws. The mean value was taken as an index of paws grip strength.

1.1.4. Locomotor activity: Open-field test

The spontaneous locomotor activity of mice was evaluated in a white polyvinyl chloride open field apparatus (50 cm long x 50 cm wide x 50 cm high) where the tested mice can move freely. Virtual areas, a central square and a peripheral corridor, were determined with video-tracking software (Viewpoint, Lyon, France). During 15 minutes, total distance traveled, time spent and distance traveled in each area of the field were recorded with the video tracking system. Results are expressed as the total distance traveled and the percentage of distance travelled in central area calculated as distance travelled in central area / total distance travelled in the entire field.

1.1.5. Short term and long term memories: Object recognition test

The object recognition test allows to assess the episodic memory of mice, at short term with an ITI of 10 minutes or at long term with an ITI of 60 minutes. The test was set of 2 trials. During the first trial, T1, the mouse was placed in a white polyvinyl chloride cage (36 cm long x 14 cm wide x 21 cm high) filled of sawdust and was subjected to 2 identical objects placed at the 2 opposite sides of the cage. The session was stopped after 20 seconds of object exploration. A cut-off time was fixed at 5 minutes and mice that did not reached this criterion were excluded of study. Between T1 and T2, the mouse was removed in the home cage for an ITI of 10 minutes or 60 minutes. In the second trial T2, one object was changed by a new object and during 5 minutes the exploration time of each object was measured, allowing to define a percentage of recognition (exploration time of new object / total exploration time of both objects).

1.1.6. Working memory: Y-maze

The Y-maze assesses the natural tendency of rodent to explore a new environment and to establish a strategy of alternation using working memory. Spontaneous alternation behaviour and exploratory activity were recorded in a Y maze. The apparatus was made of three equal arms (40 cm long x 10 cm wide x 16 cm high) made of black polyvinyl chloride. The starting arm and the two arms forming the Y were radiating at an angle of 120° from each other. Without prior habituation to the apparatus, each mouse was placed at the end of one arm, facing the end wall of the arm, and allowed to move freely through the maze during a 10-minutes session. The initial arm was alternated within the group of mice to prevent bias of arm placement. Latency to leave the first arm and total number and sequence of entries into each arm were scored for each mouse. An arm entry was counted when the mouse had all four paws inside the arm. Mice that completed less than eight arm entries within 10 minutes were excluded from further analysis. Y-maze performance was calculated by methods described in current literature. A spontaneous alternation was defined as entries into all three arms on three consecutive choices. The alternation score (%) for each mouse was defined as the ratio of the actual number of alternations to the total possible number of alternations over the testing period: $\% \text{ Alternation} = 100 \times [(\text{Number of alternations}) / (\text{Total arm entries} - 2)]$ and represent an index of working memory. Total entries were scored as an index of locomotor activity and the latency to exit the starting arm as emotionality-related behaviour.

1.1.7. Sociability and social recognition test

The sociability and social recognition test allows, first, to define the level of sociability of mice and, second, to evaluate a component of memory, the preference for social novelty. The test was set of 3 sessions. Between each session the mouse was removed in the home cage for 5 minutes. In the habituation session, the mouse was placed in the middle of a white polyvinyl chloride open-field (50 cm long x 50 cm wide x 50 cm high) containing 2 empty wire cups (an inverted stainless steel wire pencil cup; Galaxy, Kitchen Plus, <http://www.kitchen-plus.com>) on both sides. A heavy cup was placed on the top of each inverted wire pencil cup to prevent the subject from climbing on top or moving it. The mouse was allowed to freely explore for 5 minutes. Exploration times and movements of the mice were recorded using a video tracking system (Viewpoint, Lyon, France) that allowed to define virtual zones in the field; circles around each cup for exploration times and rectangle areas for time spent in each part of the field (Fig.1). In the T1 session (length 5 minutes), an unfamiliar adult WT female mouse was placed in one of the wire cups. This session allows the evaluation of the sociability index (exploration time of unfamiliar mice – exploration time of empty cup / total exploration time of both cups). In T2 session (length 5 minutes), while the first intruder is still posted in his wire cup, another unfamiliar adult mouse

was placed in the second cups. The time spent to explore the new intruder compared to total exploration time defines the percentage of social recognition.

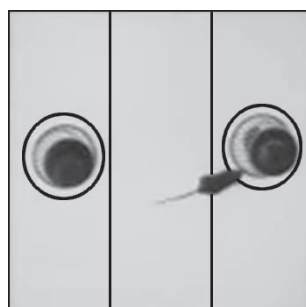


Fig.1 Sociability and social recognition test setup. The tested mouse is currently exploring the intruder mouse confined in the wire cage. Black lines represent the virtual zones defined with the video-tracking software and used to determine exploration times (circles) and movements (rectangles) of mice in the field.

1.1.8. Anxiety: Elevated-plus-maze

The elevated plus maze (EPM) assesses the natural conflict between the tendency of mice to explore a novel environment and the tendency to avoid a brightly lit, elevated, open area (Rodgers and Dalvi, 1997). The EPM comprised two open arms and two closed arms (37 cm long x 6 cm wide) that extended from a central platform (6 cm x 6 cm). The apparatus was constructed from Plexiglas (black floor and walls) and elevated at 50 cm above floor level. The mouse was placed on the central platform, facing one of the enclosed arms, and was allowed to explore the maze for 10 minutes. The distance traveled, the number of open and closed arm entries and the time spent in different parts of the maze (open and closed arms, central platform) were recorded with a video tracking system (Viewpoint, Lyon, France). Results are expressed as the total as the number of arm entries and the percentage of time spent in the open arms.

1.1.9. Anxiety: Marble burying test

The procedure for marble burying was adapted with minor modifications from previously described (Millan et al., 2001). Mice were individually placed in polyvinyl chloride cages (dimensions 36 cm long x 21 cm x 14 cm) containing a 4-cm layer of sawdust and 20 glass marbles (diameter 1.6 cm) evenly spaced over the cage (five rows of four marbles). Mice freely explore the cage during 30 minutes. The number of marbles buried more than two thirds in the sawdust was scored at 30 minutes.

1.1.10. Thermal hyperalgesia: Tail flick test

Level of heat pain sensitivity was evaluated in the tail flick test. The mouse body was maintained in a towel to only let the tail appearing. It consists in immersing the distal part of the mouse tail in warm

water at 46°C, 48°C or 52°C. Before the test, a habituation session was necessary to familiarize mice with the contention and the tail immersion to avoid stress due to manipulation. The habituation consisted in 4 trials on 4 consecutive days in which the latency between immersion in 46°C water and the fast withdrawal of the tail was manually recorded. To avoid tissue lesions, a time cut-off was set at 30 seconds of tail immersion. After each trial, the mouse tail was dried and the animal was removed in the home cage for an inter-trial interval (ITI) of 15 minutes. The test phase in the 46°C condition was performed in same conditions on the fifth day immediately after the habituation session. 48°C and 52°C conditions were realized consecutively and each required only one day of habituation. The test phases consisted also in 4 trials with an ITI of 15 minutes and results are expressed as the mean of the 4 trials. For each genotype, 14 mice were tested every three months from 3 to 15 months.

1.1.11. Thermal allodynia: Thermal place preference test

The thermal place preference test enables to evaluate the heat/cold allodynic sensitivity of mice. Two hot/cold analgesia plates (34 cm long x 8 cm wide) (Bioseb, Paris, France) were placed side by side such that the adjacent thermal surfaces were enclosed in a single chamber of transparent Plexiglas (34 cm long x 16 cm wide x 25 cm high). The temperature of each plate was controlled at $\pm 0.1^\circ\text{C}$. The choice of temperatures was determined in accordance with literature (Shimizu et al., 2005; Noël et al., 2009). To evaluate heat/cold allodynia, mice were tested on 3 sessions, each during 5 minutes. In heat allodynia habituation session, plates were both at 34°C. In the second session only the plate 1 was adjusted at 38°C, the plate 2 remaining at 34°C. In the third session plate 1 was adjusted at 42°C, plate 2 remaining at 34°C. To evaluate cold allodynia, in habituation session plates were both at 30°C. In the second session the plate 1 was adjusted at 24°C and in the third session the plate 1 was adjusted at 18°C, while the plate 2 remained at 30°C. The freely movements of the mice between the two plates were recorded with a videotracking system (Viewpoint, Lyon, France) over 5 minutes by recording the cumulative time spent and the distance travelled on each plate. Results are presented as the percentage of time spent on the plate 2 (habituation temperature: 34°C or 30°C in heat and cold test respectively) compared to the plate 1 (modified temperature: 34/38/42°C or 30/24/18°C in heat and cold test respectively) and the cumulative distance travelled. For each genotype, 14 mice were tested every three months from 3 to 15 months.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Mice with deletion of *Plp1* gene (*Plp* null) or with extra copies of the *Plp1* gene (*Plp* overexpressing) and their wild-type (WT) littermates were generated as previously described (Klugmann et al., 1997). Mice

were bred for 15 generations into the C57BL/6N background using mice from the breeding colony of the Max Planck Institute of Experimental Medicine and then transferred to our animal facility (kind gift from Pr K.A. Nave, Gottingen Germany). At weaning, Plp null heterozygous females (Plp null hetero) and their WT littermates were selected and bred together. The same selection was made with Plp overexpressing heterozygous females (Plp overexpressing hetero) and their WT littermates. Genotyping was performed as previously described (Klugmann et al., 1997). Mice were housed eight per cage in a temperature (22 °C) controlled environment under a 12:12 light/dark cycle (light from 7:00 AM. to 7:00 PM.), with *ad libitum* access to food (Harlan pellets, Harlan Gannat, France) and water. Experiments were performed in accordance with French and European Economic Community guidelines for the care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering (86/09/EEC–Council Directive of 24 November 1986).

2.2. Statistical analysis

Behavioural data were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, with the age (months) as the within-subjects (i.e. repeated) factor, and the genotype (transgenic vs. WT mice) as the between-subjects factor. Post-hoc comparisons were carried out with Fisher's PLSD post hoc tests for multiple comparisons, between transgenic and WT mice, at each time point. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Body weight

In Plp null heterozygous mice, when weight was considered, a significant effect of age [$F(4,170)=61.31$, $p < 0.001$] and genotype [$F(1,170)=15.67$, $p < 0.001$] was identified. The age x genotype interaction was also significant [$F(4,170)=3.48$, $p < 0.01$]. Post-hoc analysis revealed a statistically significant decrease in body weight of Plp null heterozygous mice at 12 and 15 months old ($p < 0.05$ and < 0.01 , respectively, PLSD Fischer test) compared to WT mice (**Table 1A**).

In Plp overexpressing mice, when weight was considered, a significant effect of age [$F(4,170)=39.20$, $p < 0.001$] but not genotype [$F(1,170)=0.29$, $p > 0.05$] was identified. No age x genotype interactions [$F(4,170)=0.72$, $p > 0.05$] were identified (**Table 1B**).

A		WT	Plp null hetero	
3 months	21,00	+/- 0,29	20,80 +/- 0,25	ns
6 months	23,46	+/- 0,20	23,22 +/- 0,36	ns
9 months	24,94	+/- 0,37	24,07 +/- 0,35	ns
12 months	26,02	+/- 0,39	24,75 +/- 0,33	*
15 months	28,19	+/- 0,62	25,91 +/- 0,38	**

B		WT	Plp overexpressing hetero	
3 months	21,55	+/- 0,36	21,31 +/- 0,36	ns
6 months	23,38	+/- 0,25	23,58 +/- 0,42	ns
9 months	26,30	+/- 0,56	26,01 +/- 0,51	ns
12 months	25,52	+/- 0,47	26,35 +/- 0,60	ns
15 months	27,50	+/- 0,65	27,13 +/- 0,43	ns

Table 1. Body weight of WT and transgenic heterozygous mice from 3 to 15 months of age.

(A) Body weight (in grams) \pm SEM of Plp null heterozygous mice and their WT littermates.

(B) Body weight (in grams) \pm SEM of Plp overexpressing heterozygous mice and their WT littermates.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: not significant

3.2. Absence of motor dysfunction in heterozygous mice lacking PLP protein and in overexpressing mice

3.2.1. Rotarod: Motor coordination

We first assessed whether there were differences in the motor characteristics of transgenic mice compared to their respective WT littermates in the rotarod test and the grip test.

Considering the performances of Plp null heterozygous mice in rotarod, significant main effects of age [$F(4,170)=6.19$, $p < 0.001$] and genotypes [$F(1,170)=15.07$, $p < 0.001$] were identified. No age x genotypes interaction [$F(4,170)=0.57$, $p > 0.05$] was identified. Post-hoc analysis revealed a statistically significant increase in latency to fall in Plp null heterozygous mice at age of 6 and 9 months ($p < 0.01$ and < 0.05 , respectively, PLSD Fischer test) compared to WT mice (**Fig.1A**).

Considering the performances of Plp overexpressing heterozygous mice in rotarod, a significant main effect of age [$F(4,170)=6.78$, $p < 0.001$] but not of genotype [$F(1,170)=1.87$, $p > 0.05$] was identified. No age x genotypes interaction [$F(4,170)=0.89$, $p > 0.05$] was identified (**Fig.1B**).

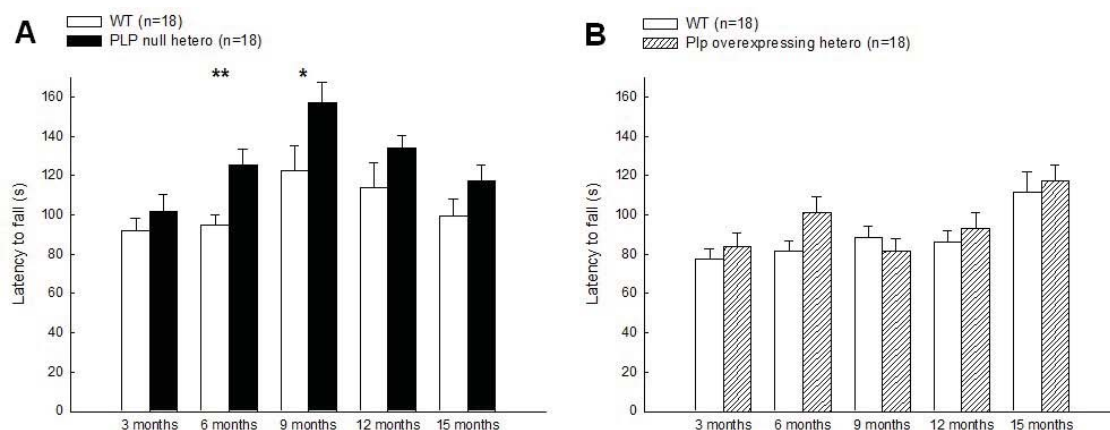


Figure 1. Evaluation of motor coordination of transgenic and WT mice from 3 to 15 months, in the rotarod test.

(A) Representation of the latency to fall \pm SEM of Plp null heterozygous mice and their WT littermates. Plp null heterozygous mice exhibit increase in latency to fall at 6 and 9 months compared to WT mice.

(B) Representation of latency to fall \pm SEM of Plp overexpressing mice and their WT littermates show no difference between genotypes whatever the tested ages.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, PLSD Fisher test.

3.2.2. Grip test: muscular strength

Considering the performances of Plp null heterozygous mice in the grip test with 2 or 4 paws a significant main effect of genotype [all F 's(1,170) ≥ 4.47 , all p 's < 0.05] was identified, but no effect of age [all F 's(4,170) ≤ 1.84 , all p 's > 0.05] and no interaction age x genotype [all F 's(4,170) ≤ 2.19 , all p 's > 0.05] were identified. Post-hoc analyses revealed a statistically significant decrease in grip strength in Plp null heterozygous mice with 2 paws, at age of 6 and 12 months ($p < 0.05$, PLSD Fischer test), and with 4 paws, at 6 and 15 months ($p < 0.05$, PLSD Fischer test) compared to WT mice (**Fig.2A**).

Considering the performances of Plp overexpressing heterozygous mice in the grip test with 2 or 4 paws, a significant main effect of age [all F 's(4,170) ≥ 3.55 , all p 's < 0.01] and no interaction age x genotype [all F 's(4,170) ≤ 1.83 , all p 's > 0.05] were identified. In the grip test with 4 paws, a significant main effect of genotype [$F(1,170) = 5.05$, $p < 0.05$] was identified, but not in the grip test with 2 paws [$F(1,170) = 0.89$, $p > 0.05$]. Post-hoc analysis revealed a statistically significant decrease of grip strength in 3-month-old Plp overexpressing heterozygous mice ($p < 0.05$, PLSD Fischer test) compared to WT mice (**Fig.2B**).

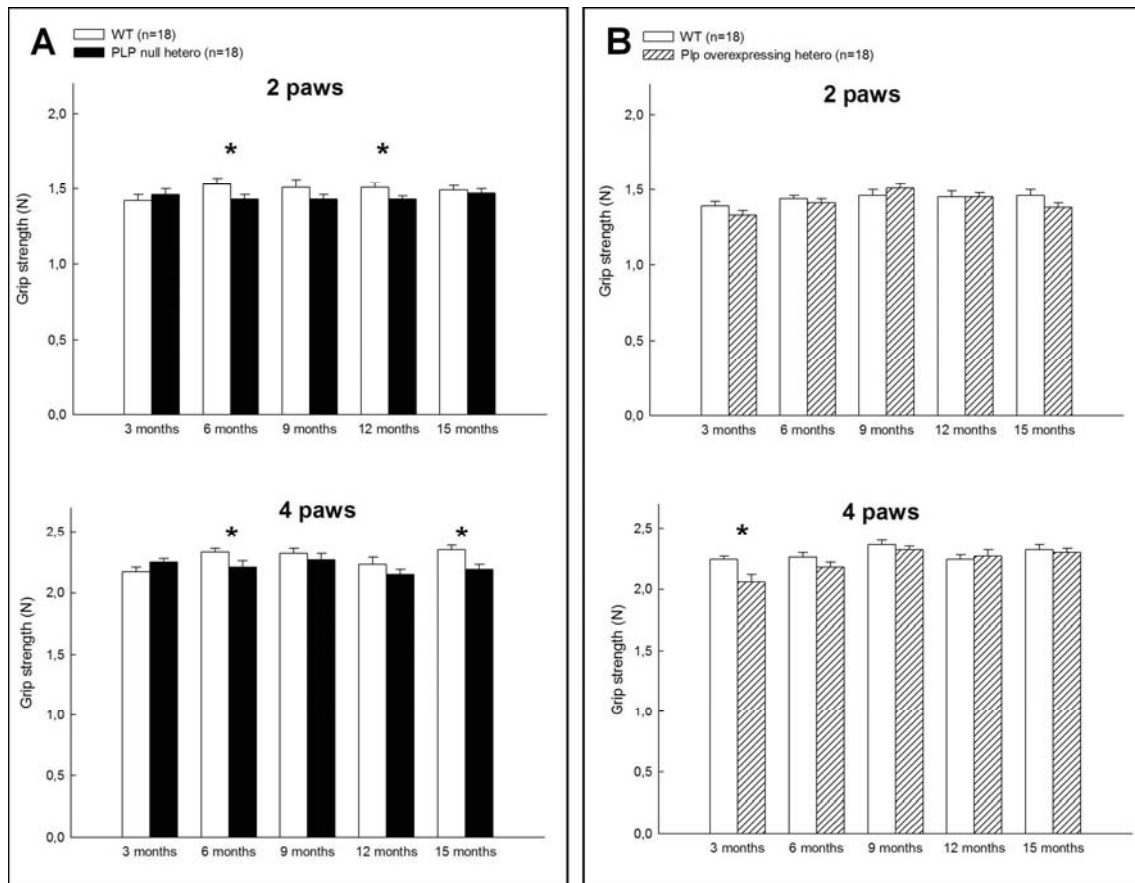


Figure.2. Evaluation of muscular strength of transgenic and WT mice from 3 to 15 months in the grip test.

(A) Representation of the fore-limb grip strength \pm SEM (A, on top) and 4 paws grip strength \pm SEM (A, down) of Plp null heterozygous mice and their respective WT littermates.

(B) Representation of the fore-limb grip strength \pm SEM (B, on top) and 4 paws grip strength \pm SEM (B, down) of Plp overexpressing heterozygous mice and their respective WT littermates.

* $p < 0.05$, PLSD Fisher test

3.3. *Hyperactivity in heterozygous mice lacking PLP protein but not in overexpressing mice*

Considering the total distance travelled and time spent in central zone of the open field by Plp null heterozygous mice, significant main effects of age [all F 's(4,170) ≥ 3.47 , all p 's < 0.01] and genotype [all F 's(1,170) ≥ 6.94 , all p 's < 0.01] were identified. Considering the total distance travelled the age x genotype interaction was significant [$F(4,170) = 2.63$, $p < 0.05$, but not when considering the time spent in central zone [$F(4,170) = 0.81$, $p > 0.05$]. Post-hoc analyses revealed that Plp null heterozygous mice significantly increase the total distance travelled from 6 months (all p 's < 0.01 , PLSD Fischer test) and increase the time spent in central zone at 15 months of age ($p < 0.05$, PLSD Fischer test) compared to respective WT mice (**Fig.3A**).

Considering the total distance travelled and time spent in the central zone of the open-field by Plp overexpressing heterozygous mice, a significant main effect of age [all F 's(4,170) ≥ 5.26 , all p 's < 0.001],

but not genotype [all F 's(1,170)≤0.30, all p 's>0.05] and no interaction age x genotype [all F 's(4,170)≤1.34, all p 's>0.05] were identified (**Fig.3B**).

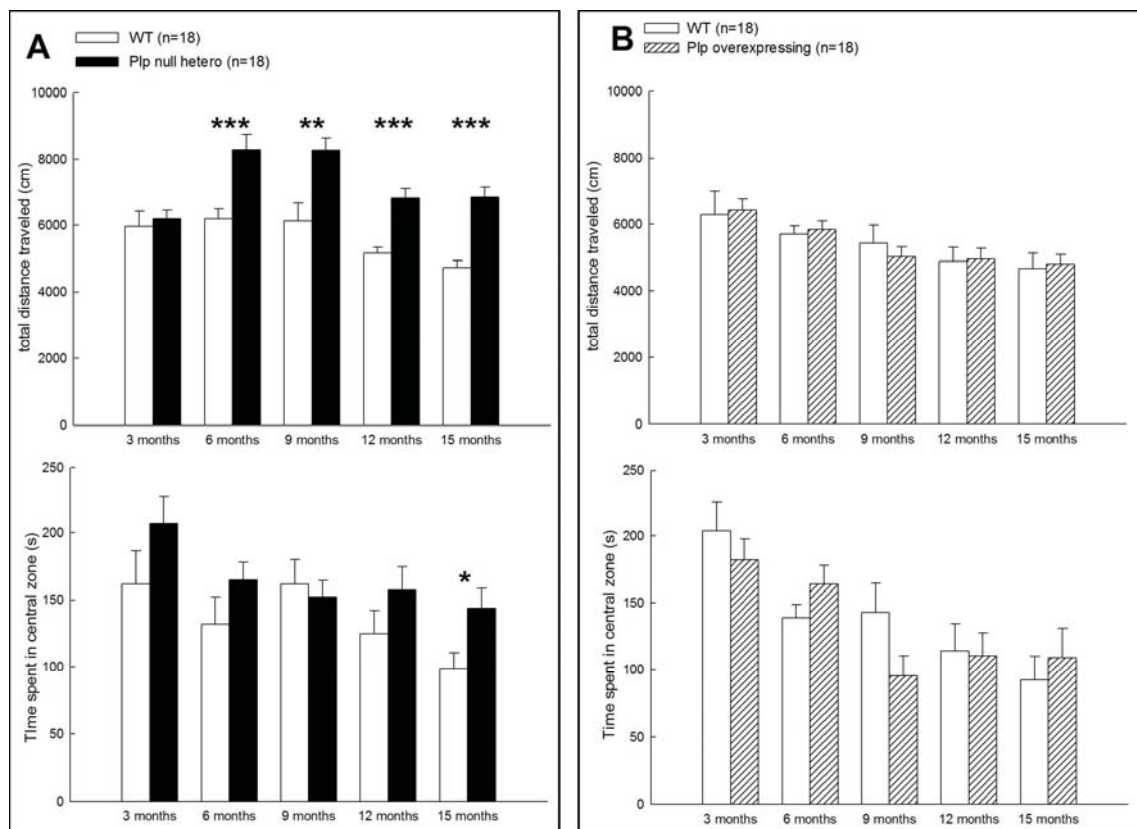


Figure 3. Evaluation of time spent in central area and locomotor activity of transgenic and WT mice from 3 to 15 months, in 15 minutes-session in the open-field.

(A) Total distance traveled \pm SEM (A, on top) and time spent in central area \pm SEM (A, down) by the Plp null heterozygous mice and their WT littermates.

(B) Total distance traveled \pm SEM (B, on top) and time spent in central area \pm SEM (B, down) by the Plp overexpressing heterozygous mice and their WT littermates.

** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, PLSD Fisher test.

3.4. Working memory alterations in heterozygous mice lacking PLP protein but not in overexpressing mice

3.4.1. Y-maze: working memory

Considering percentage of alternations of Plp null heterozygous mice in the Y-maze, significant main effects of age [$F(4,170)=3.57$, $p < 0.01$] and genotype [$F(1,170)=35.04$, $p < 0.001$] were identified. The age x genotype interaction was not significant [$F(4,170)=1.74$, $p > 0.05$]. Post-hoc analysis revealed a statistically significant decrease in percentage of alternation by Plp null heterozygous compared to WT mice at 6, 9 and 12 months ($p < 0.001$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively, PLSD Fischer test) (**Fig.4A**).

Considering percentage of alternations of Plp overexpressing heterozygous mice in the Y-maze, significant main effect of age [$F(4,170)=4.10$, $p<0.01$], but not genotype [$F(1,170)=0.19$, $p>0.05$] was identified. The age x genotype interaction was not significant [$F(4,170)=0.87$, $p>0.05$] (**Fig.4B**).

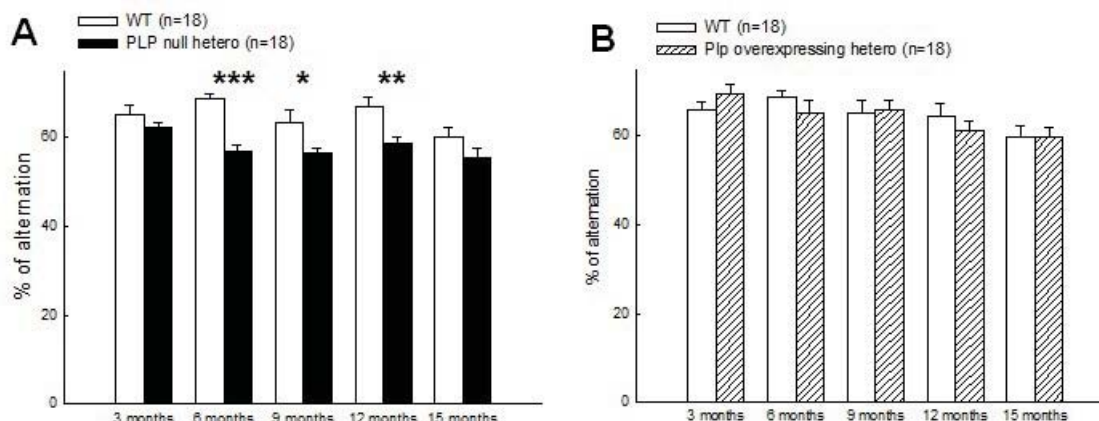


Figure 4. Evaluation of percentage of alternations of transgenic and WT mice from 3 to 15 months, in the Y-maze.

(A) Percentage of alternation \pm SEM of Plp null heterozygous mice and their WT littermates.

(B) Percentage of alternation \pm SEM of Plp overexpressing heterozygous mice and their WT littermates.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, PLSD Fisher test.

Considering the arms entries number of Plp null and Plp overexpressing heterozygous mice in the Y-maze, no significant main effect of age [all F 's(4,170) ≤ 1.39 , all p 's >0.05] and no interaction age x genotype [all F 's(1,170) ≤ 2.78 , all p 's >0.05] were identified. In Plp null heterozygous mice a significant effect of genotype [$F(1,170)=8.12$, $p<0.01$] was identified, but not in Plp overexpressing heterozygous mice [$F(1,170)=0.23$, $p>0.05$]. Post-hoc analyses revealed a significant increase in total arms entries number in 9- and 12-month-old Plp null heterozygous ($p<0.05$ and $p<0.01$ respectively, PLSD Fischer test) (**Table 2A**) and in 9- and 12-month-old Plp null heterozygous ($p<0.05$, PLSD Fischer test) (**Table 2B**) compared to their respective WT mice.

A	WT	Plp null hetero	
3 months	36,78 \pm 2,65	36,72 \pm 2,40	ns
6 months	29,11 \pm 2,08	35,28 \pm 3,29	ns
9 months	28,00 \pm 2,53	35,78 \pm 2,66	*
12 months	28,06 \pm 2,19	39,94 \pm 2,19	**
15 months	34,61 \pm 8,54	33,89 \pm 2,46	ns

B	WT	Plp overexpressing hetero	
3 months	30,06 \pm 1,36	26,56 \pm 2,35	ns
6 months	28,00 \pm 1,39	26,50 \pm 2,10	ns
9 months	22,61 \pm 1,91	28,78 \pm 1,60	*
12 months	24,78 \pm 2,19	28,89 \pm 1,56	*
15 months	30,50 \pm 3,21	27,22 \pm 2,03	ns

Table 2. Total entries number of WT and transgenic heterozygous mice from 3 to 15 months of age in the Y maze.

(A) Total entries number \pm SEM of Plp null heterozygous mice and their respective WT littermates.

(B) Total entries number \pm SEM of Plp overexpressing heterozygous mice and their respective WT littermates.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, ns: not significant

Considering the latency to leave the Y-maze first arm by Plp null and Plp overexpressing heterozygous mice, a significant main effect of age [all F 's(4,170) ≥ 4.09 , all p 's < 0.01] but not genotype [all F 's(1,170) ≤ 1.93 , all p 's > 0.05] were identified. In Plp overexpressing heterozygous mice, the age x genotype interaction was significant [$F(4,170) = 3.38$, $p < 0.05$], but not in Plp null heterozygous mice [$F(4,170) = 0.37$, $p > 0.05$]. Post-hoc analysis revealed a statistically significant increase in total arms entries number in Plp overexpressing heterozygous at 3 months and a significant decrease at 6 months (all p 's < 0.05 , PLSD Fischer test) compared to WT mice (**Table 3**).

A	WT	Plp null hetero	
3 months	17,33 +/- 4,39	25,39 +/- 4,75	<i>ns</i>
6 months	14,50 +/- 2,33	19,56 +/- 5,16	<i>ns</i>
9 months	24,44 +/- 11,58	36,17 +/- 9,52	<i>ns</i>
12 months	9,72 +/- 1,24	11,00 +/- 3,51	<i>ns</i>
15 months	10,44 +/- 3,79	28,67 +/- 2,11	<i>ns</i>

B	WT	Plp overexpressing hetero	
3 months	20,06 +/- 2,53	42,33 +/- 10,09	*
6 months	30,78 +/- 4,69	18,78 +/- 2,04	*
9 months	18,33 +/- 4,90	21,83 +/- 6,25	<i>ns</i>
12 months	12,67 +/- 1,90	15,17 +/- 2,00	<i>ns</i>
15 months	14,67 +/- 2,96	16,28 +/- 2,33	<i>ns</i>

Table 3. Latency of first new arm entry of WT and transgenic heterozygous mice from 3 to 15 months of age in the Y maze.

(A) Latency of first arm entry (in seconds) \pm SEM of Plp null heterozygous mice and their respective WT littermates.

(B) Latency of first arm entry (in seconds) \pm SEM of Plp overexpressing heterozygous mice and their respective WT littermates.

* $p < 0.05$, ns: not significant

3.4.2. Objects recognition test: episodic memory

Considering the percentage of novel object recognition of Plp null heterozygous mice with an ITI of 10 minutes or 60 minutes, no significant effect of age [all F 's(4,170) ≤ 1.16 , all p 's > 0.05] and no interaction age x genotype [all F 's(4,170) ≤ 0.79 , all p 's > 0.05] were identified. With an ITI of 60 minutes a significant effect of genotype [$F(1,170) = 6.94$, $p < 0.01$] was identified, but not with an ITI of 10 minutes [$F(1,170) = 2.83$, $p > 0.05$]. Post-hoc analysis revealed a statistically significant decrease in percentage of recognition with an ITI of 60 minutes by 12-month-old Plp null heterozygous compared to WT mice ($p < 0.05$, PLSD Fischer test) (**Fig.5A**).

Considering percentage of novel object recognition of Plp overexpressing heterozygous mice in object recognition test with an ITI of 10 minutes or 60 minutes, no significant main effect of age [all F 's(4,170) ≤ 1.14 , all p 's > 0.05] or genotype [all F 's(1,170) ≤ 1.28 , all p 's > 0.05] and no age x genotype interaction [all F 's(4,170) ≤ 0.79 , all p 's > 0.05] were identified (**Fig.5B**).

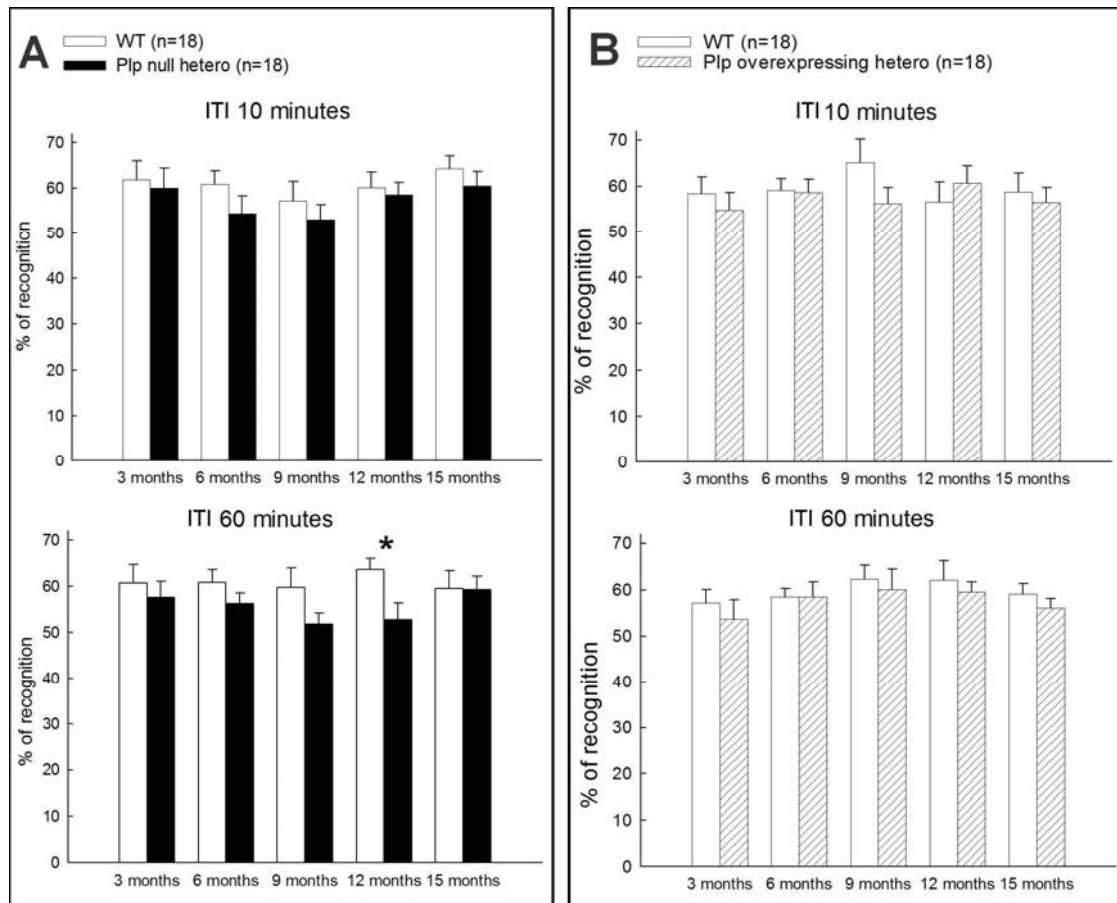


Figure 5. Evaluation of short term and long term memories of transgenic and WT mice from 3 to 15 months, in the object recognition test.

(A) Representation of the percentage of novel object recognition \pm SEM in Plp null heterozygous mice and their WT littermates, with an inter-trial interval (ITI) of 10 minutes (A, on top) or 60 minutes (A, down).

(B) Representation of the percentage of novel object recognition \pm SEM in Plp overexpressing heterozygous mice and their WT littermates, with an ITI of 10 minutes (B, on top) or 60 minutes (B, down).

* $p < 0.05$, PLSD Fisher test.

3.5. *Neither sociability nor social recognition deficit in heterozygous mice lacking PLP protein and in overexpressing mice*

Considering sociability index and the percentage of social recognition of Plp null heterozygous mice in the sociability test, no significant main effect of genotype [all F 's(1,170) ≤ 2.66 , all p 's > 0.05] or age x genotype interaction [all F 's(4,170) ≤ 1.12 , all p 's > 0.05] was identified. Considering the sociability index, no significant main effect of age [$F(4,170) = 2.39$, $p > 0.05$] was identified, but considering the percentage of social recognition a significant effect of age [$F(4,170) = 3.17$, $p < 0.05$] was identified (**Fig.6A**).

Considering sociability index and the percentage of social recognition of Plp overexpressing heterozygous mice in the sociability test, no significant main effect of genotype [all F 's(1,170) ≤ 0.43 , all p 's > 0.05] or age x genotype interaction [all F 's(4,170) ≤ 1.26 , all p 's > 0.05] was identified. Considering the

sociability index, a significant main effect of age [$F(4,170)=3.25$, $p<0.05$] was identified, but not considering the percentage of social recognition [$F(4,170)=0.78$, $p>0.05$] (**Fig.6B**).

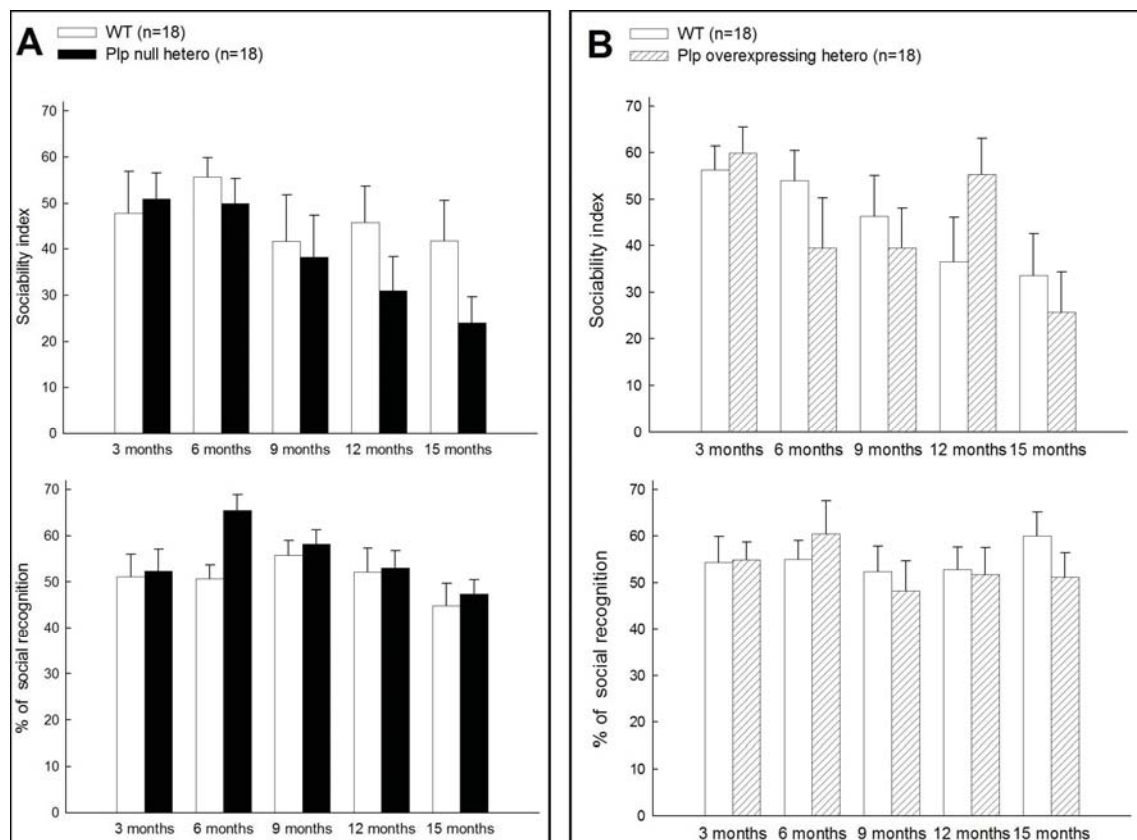


Figure 6. Evaluation of sociability index and percentage of social recognition of transgenic and WT mice from 3 to 15 months.

(A) Sociability index (A, on top) and percentage of social recognition (A, down) \pm SEM of Plp null heterozygous mice and their WT littermates.

(B) Sociability index (B, on top) and percentage of social recognition (B, down) \pm SEM of Plp overexpressing mice and their WT littermates.

3.6. Abnormal anxiety behaviour in heterozygous mice lacking PLP protein but not in overexpressing mice

3.6.1. Elevated-Plus-Maze: anxiety

Considering the percentage of time spent in the open arms and the number of arms entries of Plp null heterozygous mice in the EPM, significant main effects of age [all F 's(4,170) ≥ 3.77 , all p 's <0.01], genotype [all F 's(1,170) ≥ 24.29 , all p 's <0.001] and age x genotype interaction [all F 's(4,170) ≥ 2.51 , all p 's <0.05] were identified. Post hoc analyses revealed that Plp null heterozygous mice spend significantly more time in open arms of the maze at 12 and 15 months of age ($p<0.001$, PLSD Fischer test), and increased significantly the number of arms entries from 6 months (all p 's <0.01 , PLSD Fisher test) compared to respective WT mice (**Fig.7A**).

Considering the percentage of time spent in the open arms and the arms entries number of Plp overexpressing heterozygous mice in the EPM, no significant main effect of age [all F 's(4,170) ≤ 2.13 , all p 's > 0.05] or age x genotype interaction [all F 's(4,170) ≤ 0.50 , all p 's > 0.05] was revealed. Considering the arms entries number, a significant effect of genotype [$F(1,170)=13.81$, $p<0.001$] was identified, but not considering the percentage of time spent in open arms [$F(1,170)=2.72$, $p>0.05$]. Post hoc analysis revealed that 15-month-old Plp overexpressing heterozygous significantly increase the arms entries number compared WT mice ($p<0.05$, PLSD Fischer test) (**Fig.7B**).

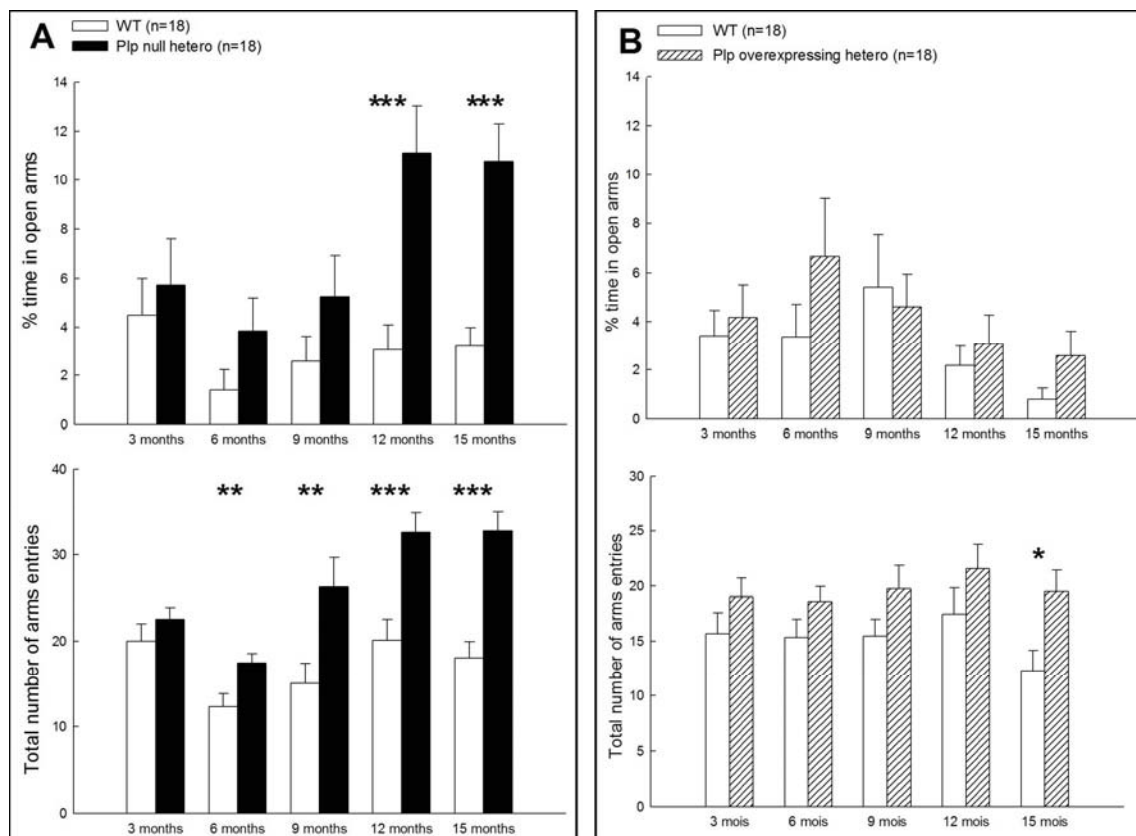


Figure 7. Evaluation of percentage of time spent in the open arms of transgenic and WT mice from 3 to 15 months, in the EPM.

(A) Percentage of time spent in open arms of the maze (A, top) and total number of arms entries (A, down) \pm SEM of Plp null heterozygous mice and their WT littermates.

(B) Percentage of time spent in open arms of the maze (B, top) and total number of arms entries (B, down) \pm SEM of Plp overexpressing heterozygous mice and their WT littermates.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, PLSD Fisher test

3.6.2. Marble burying test: anxiety

Considering the number of marbles buried by Plp null heterozygous mice, significant main effects of age [$F(4,170)=6.30$, $p<0.001$] and genotype [$F(1,170)=19.36$, $p<0.001$] but no age x genotype interaction [$F(4,170)=0.98$, $p>0.05$] were identified. Post hoc analysis revealed that Plp null heterozygous

significantly decrease the number of marbles buried from 9 months (all p 's<0.05, PLSD Fischer test) compared to WT mice (**Fig.8A**).

Considering the number of marbles buried by Plp overexpressing heterozygous mice, a significant main effect of age [$F(4,170)=6.11$, $p<0.001$] but not genotype [$F(1,170)=0.99$, $p>0.05$] and no age x genotype interaction [$F(4,170)=2.52$, $p<0.05$] were identified. Post hoc analysis revealed that 9-month-old Plp overexpressing heterozygous significantly increase the number of marble buried compared to WT mice ($p<0.01$, PLSD Fisher test) (**Fig.8B**).

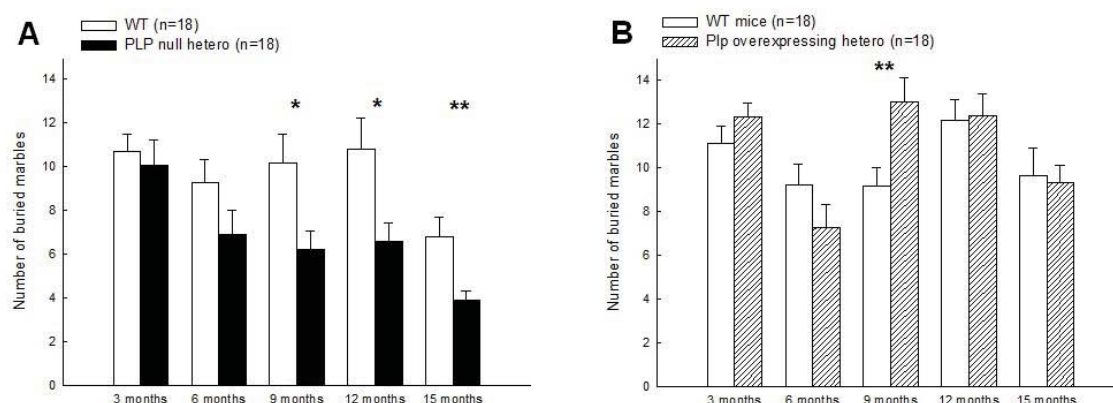


Figure 8. Evaluation of number of marbles buried of transgenic and WT mice from 3 to 15 months, in the marble burying test.

(A) Number of marbles buried \pm SEM by Plp null heterozygous mice and their WT littermates.

(B) Number of marbles buried \pm SEM by Plp overexpressing heterozygous mice and their WT littermates.

* $p<0.05$ and ** $p<0.01$, PLSD Fisher test.

3.7. Thermal pain hypersensitivity in heterozygous mice lacking PLP protein but not in overexpressing mice

Considering the tail flick latencies of Plp null and Plp overexpressing heterozygous mice at 48°C, a significant main effect of age [all F 's(4,170) ≥ 4.79 , all p 's<0.01] and genotype [all F 's(1,170) ≥ 5.77 , all p 's<0.05], but no age x genotype interaction [all F 's(4,170) ≤ 0.66 , all p 's>0.05] were identified. Post hoc analyses revealed a significant decrease in tail flick latencies in 6- and 15-month-old Plp null heterozygous compared to WT mice ($p<0.01$ and $p<0.05$ respectively, PLSD Fischer test) (**Fig.9A**), and no difference between Plp overexpressing heterozygous and WT mice at all age tested (**Fig.9B**).

A	WT	Plp null hetero	
3 months	1,41 +/- 0,09	1,33 +/- 0,06	<i>ns</i>
6 months	1,47 +/- 0,11	1,42 +/- 0,06	<i>ns</i>
9 months	1,21 +/- 0,10	1,15 +/- 0,14	<i>ns</i>
12 months	1,01 +/- 0,05	0,85 +/- 0,04	<i>ns</i>
15 months	1,11 +/- 0,04	0,97 +/- 0,04	<i>ns</i>

B	WT	Plp overexpressing hetero	
3 months	1,62 +/- 0,11	1,38 +/- 0,08	<i>ns</i>
6 months	1,30 +/- 0,07	1,29 +/- 0,09	<i>ns</i>
9 months	1,12 +/- 0,11	1,09 +/- 0,09	<i>ns</i>
12 months	1,27 +/- 0,07	1,13 +/- 0,05	<i>ns</i>
15 months	1,14 +/- 0,05	1,12 +/- 0,06	<i>ns</i>

Table 5. Tail flick latencies of WT and transgenic heterozygous mice at 52°C.

(A) Tail flick latencies (in seconds) \pm SEM of Plp null heterozygous mice and their WT littermates at 52°C.

(B) Tail flick latencies (in seconds) \pm SEM of Plp overexpressing heterozygous mice and their WT littermates at 52°C.

ns: not significant

3.8. No alteration in heat/cold allodynia in heterozygous mice lacking PLP protein.

3.8.1. Heat allodynia

Given the heat pain sensitivity of Plp null heterozygous mice in the tail flick test, we assessed more precisely sensitive features of these mice in a test of heat/cold allodynia.

Considering the time spent on plate 2 (at 34°C) by Plp null heterozygous mice, in the habituation phase, in the condition 34°C vs. 38°C, and in the condition 34°C vs. 42°C, no significant main effect of age [all F 's(4,130) \leq 2.28, all p 's $>$ 0.05] or genotype [all F 's(1,130) \leq 1.05, all p 's $>$ 0.05], and no age x genotype interaction [all F 's(4,130) \leq 1.27, all p 's $>$ 0.05] were identified (**Fig 10**).

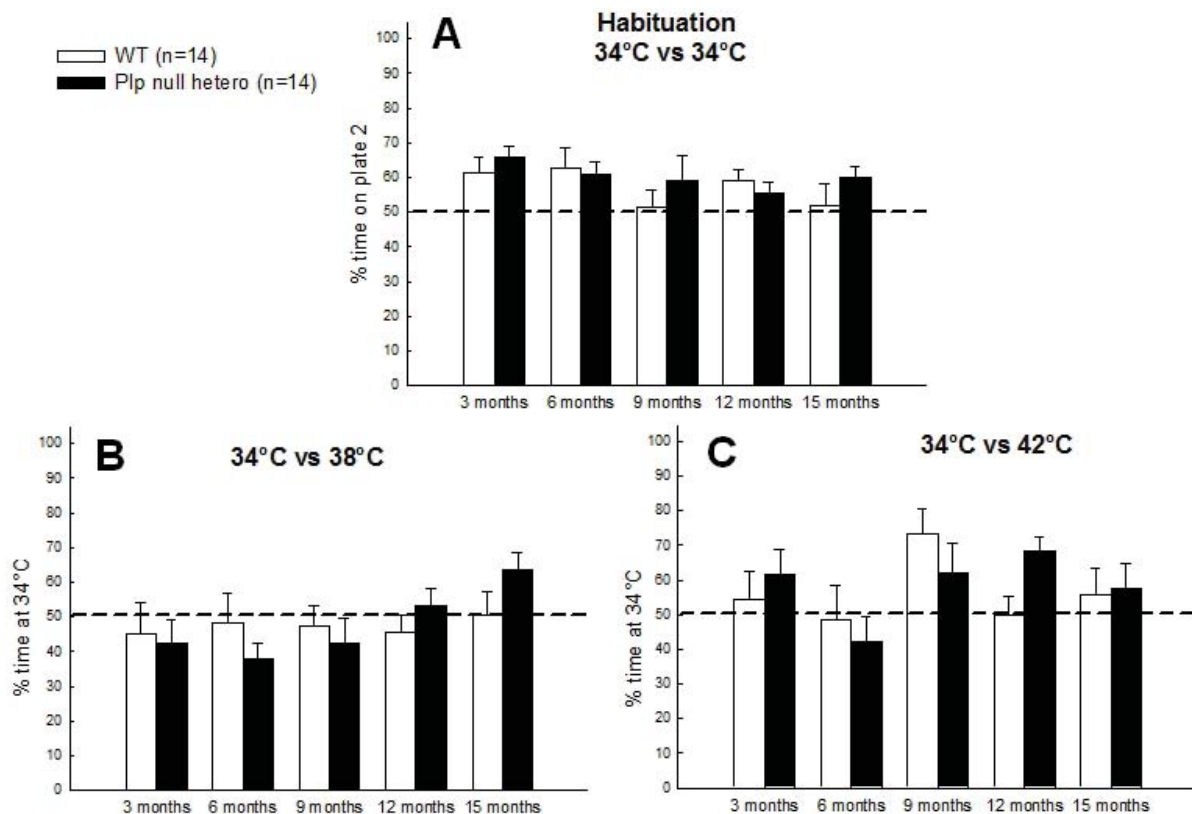


Figure 10. Evaluation of heat allodynia of Plp null heterozygous mice and their WT littermates in the thermal place preference test.

(A) Percentage of time spent on plate 2 (at 34°C) \pm SEM by Plp null heterozygous and WT mice, in the habituation phase where both plates were at 34°C.

(B) Percentage of time spent on the 34°C-plate \pm SEM by Plp null heterozygous and WT mice, in the 34°C vs. 38°C condition.

(C) Percentage of time spent on the 34°C-plate \pm SEM by Plp null heterozygous and WT mice, in the 34°C vs. 42°C condition.

In each condition, the dotted line represents an equal percentage of time spent on both plates.

Considering the total distance travelled by Plp null heterozygous mice, in the habituation phase, in the condition 34°C vs. 38°C, and in the condition 34°C vs. 42°C, a significant main effect of age [all F 's(4,130) \geq 2.51, all p 's<0.05] and genotype [all F 's(1,130) \geq 8.06, all p 's<0.01], but no age x genotype interaction [all F 's(4,130) \leq 2.41, all p 's>0.05] were identified. Post hoc analyses revealed that Plp null heterozygous mice travelled more distance than WT mice at 6 and 15 months (all p 's<0.05, PLSD Fischer test) in the habituation phase and the 34°C vs. 38°C condition, and at 3 and 6 months in the 34°C vs. 42°C condition (all p 's<0.05, PLSD Fischer test) (**Table 6**).

	34°C vs. 34°C			34°C vs. 38°C			34°C vs. 42°C		
	WT (n=14)	Plp null hetero (n=14)		WT (n=14)	Plp null hetero (n=14)		WT (n=14)	Plp null hetero (n=14)	
3 months	8905,9 \pm 420,3	10021 \pm 399,9	ns	5214,1 \pm 321,2	6200,8 \pm 368,5	ns	3997,3 \pm 231,9	5249,9 \pm 308,5	**
6 months	8182,4 \pm 892,7	11121 \pm 616,7	*	4887,8 \pm 511,4	7932,3 \pm 579,2	***	3752,9 \pm 278,3	5209,2 \pm 561,7	*
9 months	10211 \pm 1287	9654,4 \pm 929,6	ns	7228,8 \pm 1385	7060,7 \pm 1112	ns	4694,6 \pm 508,9	4900,8 \pm 634,9	ns
12 months	11922 \pm 544,8	12396 \pm 625,4	ns	7706,1 \pm 607	8489,6 \pm 643,3	ns	5901,3 \pm 297,9	6035,8 \pm 480,7	ns
15 months	7848 \pm 834,7	11695 \pm 1146	*	5784,7 \pm 475,2	8534,4 \pm 1190	*	4317,9 \pm 257,4	5395,5 \pm 723,6	ns

Table 6. Total distance travelled by WT and transgenic heterozygous mice from 3 to 15 months in all heat allodynia test conditions.

Table represents the total distance travelled (in mm) \pm SEM by Plp null heterozygous mice and their WT littermates, in habituation phase, in 34°C vs. 38°C condition and in 34°C vs. 42°C condition.

* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, ns: not significant

3.8.2. Cold allodynia

Considering the time spent on plate 2 (at 30°C) by Plp null heterozygous mice in the habituation phase, in the 30°C vs. 24°C condition, and in the 30°C vs. 18°C condition, no significant effect of genotype [all F 's(1,130) \leq 2.68, all p 's>0.05] and no age x genotype interaction [all F 's(4,130) \leq 1.85, all p 's>0.05] were identified. A significant effect of age [F (4,130)=3.77, p <0.01] was identified in the 30°C vs. 24°C condition, but not in the habituation phase [F (4,130)=1.29, p >0.05] or in the 30°C vs. 18°C condition [F (4,130)=2.10, p >0.05] (**Fig 11**).

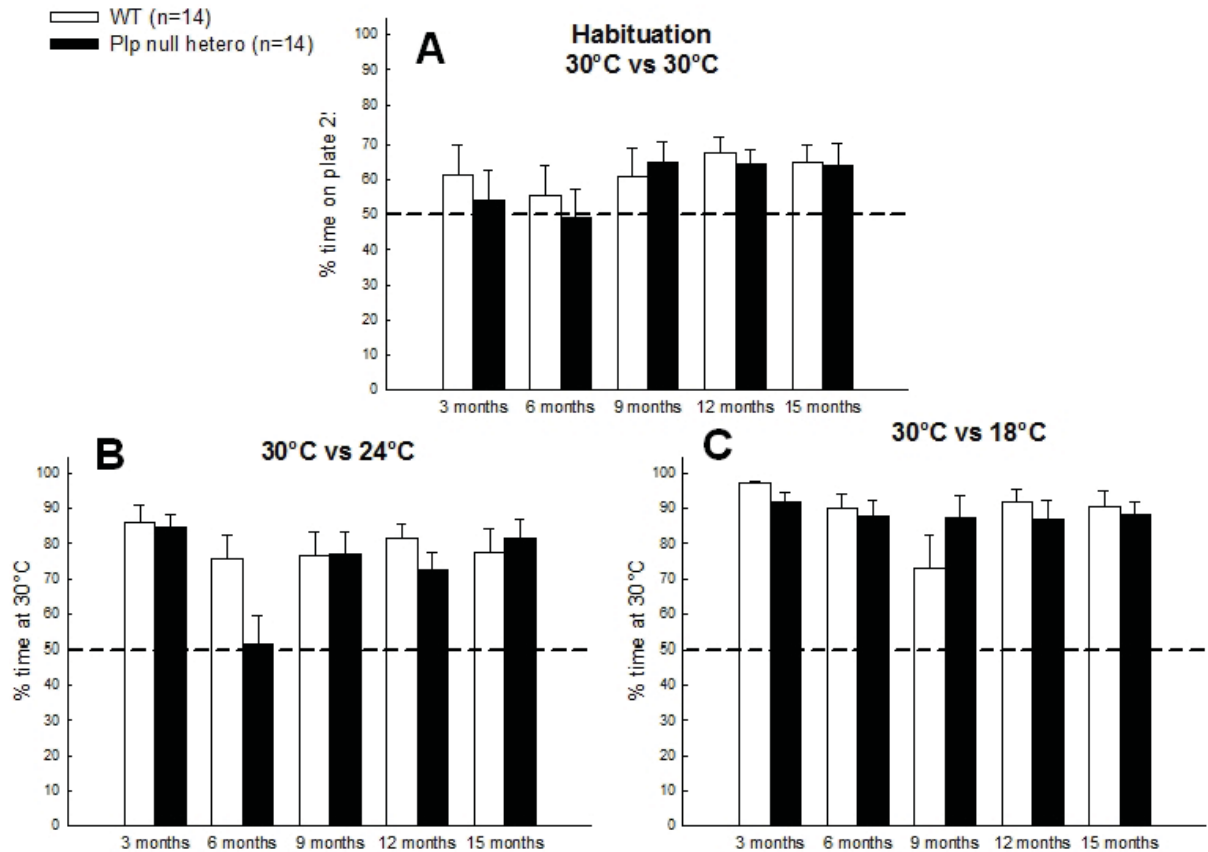


Figure 11. Evaluation of cold allodynia of Plp null heterozygous mice and their WT littermates in the thermal place preference test.

(A) Percentage of time spent on plate 2 (at 30°C) \pm SEM by Plp null heterozygous and WT mice, in the habituation phase where both plates were at 30°C.

(B) Percentage of time spent on the 30°C-plate \pm SEM by Plp null heterozygous and WT mice, in the 30°C vs. 24°C condition.

(C) Percentage of time spent on the 30°C-plate \pm SEM by Plp null heterozygous and WT mice, in the 30°C vs. 18°C condition.

In each condition, the dotted line represents an equal percentage of time spent on both plates.

Considering the total distance travelled by Plp null heterozygous mice, in the habituation phase, in the condition 30°C vs. 24°C, and in the condition 30°C vs. 18°C, a significant main effect of genotype [all F 's(1,130) \geq 9.42, all p 's $<$ 0.01] but not age [all F 's(4,130) \leq 1.28, all p 's $>$ 0.05], and no age \times genotype interaction [all F 's(4,130) \leq 1.49, all p 's $>$ 0.05] were identified. Post hoc analyses revealed that Plp null heterozygous mice travelled more distance than WT mice, at 9 and 12 months ($p<$ 0.05 and $p<$ 0.001, respectively, PLSD Fischer test) in the habituation phase, and at 12 months ($p<$ 0.05, PLSD Fischer test) in the 30°C vs. 18°C condition (**Table 7**).

	30°C vs. 30°C			30°C vs. 24°C			30°C vs. 18°C		
	WT (n=14)	<i>Plp</i> null hetero (n=14)		WT (n=14)	<i>Plp</i> null hetero (n=14)		WT (n=14)	<i>Plp</i> null hetero (n=14)	
3 months	6163,99 +/- 513,03	6497,19 +/- 713,40	ns	4781,51 +/- 505,22	5907,26 +/- 511,65	ns	4246,08 +/- 449,72	4547,13 +/- 512,78	ns
6 months	5528,59 +/- 528,42	6610,62 +/- 748,70	ns	4619,29 +/- 435,06	5573,07 +/- 478,46	ns	3957,11 +/- 267,93	4680,73 +/- 404,05	ns
9 months	5798,24 +/- 574,40	8392,29 +/- 903,65	*	4835,62 +/- 417,70	6588,14 +/- 851,52	ns	4121,18 +/- 625,12	5259,80 +/- 757,69	ns
12 months	6021,11 +/- 363,53	8347,36 +/- 326,95	***	4952,71 +/- 395,90	5922,49 +/- 349,63	ns	3779,70 +/- 231,39	4920,99 +/- 377,28	*
15 months	6343,99 +/- 413,14	6838,87 +/- 672,74	ns	4964,37 +/- 376,96	5568,96 +/- 505,00	ns	3659,34 +/- 280,81	5048,83 +/- 632,43	ns

Table 7. Total distance travelled by WT and transgenic heterozygous mice from 3 to 15 months in all cold allodynia test conditions.

Table represents the total distance travelled (in mm) \pm SEM by *Plp* null heterozygous mice and their WT littermates, in habituation phase, in 30°C vs. 24°C condition and in 30°C vs. 18°C condition.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, ns: not significant

4. Discussion

Results of the behavioural analysis in mouse model of PMD/SPG2 carrier mothers showed that female mice heterozygous for deletion of *Plp1* gene and for *Plp1* overexpression didn't exhibit the same phenotype. *Plp* null heterozygous mice exhibited with age a reduced body weight compared to WT mice, particularly after 12 months of age while *Plp* overexpressing heterozygous mice did not. About motor aspect, both genotypes showed no real defects in motor coordination or muscular strength but *Plp* null heterozygous mice showed an increased locomotor activity from 6 months of age. On the cognitive aspect, both genotypes showed no alteration of short or long term episodic memory, nor abnormality of social component, but *Plp* null heterozygous mice exhibited an important defect in working memory from 6 months of age, associated with abnormalities in anxiety-related behaviours from 9 months of age. Finally, about sensitive features, *Plp* null heterozygous mice seemed to develop a slight thermal hypersensitivity to heat mainly marked at 6 and 15 months of age, but without defects in the allodynic behaviour to cold and heat while *Plp* overexpressing heterozygous mice showed no difference with WT mice. Put together, these results strongly suggest that *Plp* null heterozygous female exhibit hyperactivity associated with anxiety, working memory alterations and to some extent sensitive defects, while *Plp* overexpressing heterozygous mice seem asymptomatic. These observations in rodent is in agreement with those described in human since some studies highlighted the onset of symptoms in mothers of SPG2 patients but not of PMD patients (Hodes et al., 1995, 1997; Nance et al., 1996; Inoue et al., 2001; Marble et al., 2007; Yiu et al., 2009). Even if *Plp* null heterozygous mice exhibit behavioural abnormalities, it is a distinct pathology from that developed by *Plp* null hemizygous males, described with additional defects in muscular strength and fewer working memory alterations.

Different hypotheses can explain symptoms of *Plp* null heterozygous females, in particular (1) modifications in the expression of age-related genes, that could be confirmed by qRT-PCR analyses focused on genes implicated in synaptogenesis or synaptic plasticity, (2) a different execution of the X inactivation processes correlated to the type of mutation carried.

Concerning the latter hypothesis, few years ago, Inoue assumed that carrier mother of *PLP1* mutations, could develop phenotypes linked to the severity of the carried mutation. In fact, analyses of several families with *PLP1* mutations highlighted phenotypic differences between mothers responsible of severe forms in their son, and those carrying mutations responsible of moderate forms (Inoue et al., 2001). Mothers of severe PMD patients, with duplications and point mutations of *PLP1*, are usually asymptomatic, while mothers of SPG2 patients or mild forms of PMD, with null or point mutations of *PLP1*, develop a late onset degenerative leukodystrophy (Raskind et al., 1991; Hodes et al., 1995, 1997). This paradoxical phenomenon may be explained by the normalization of the OLs population. Indeed, following the process of X inactivation, which primarily is an epigenetic process consisting of silencing one of the both X chromosomes and balancing X-linked gene dosage between genders, heterozygous women exhibit two populations of OLs precursors: cells with the normal *PLP1* allele and cells with only the mutant *PLP1* allele. Severe mutations of *PLP1* gene lead to abnormalities in OLs differentiation and apoptosis. Then, the surviving OLs in the mature myelin may represent only a population expressing the normal *PLP1* allele. In case of less severe mutations, mutants OLs survive during development and contribute to the formation of myelin sheath, forming a mosaic population in the mature myelin. But this “mutant” myelin is instable and breaks down, explaining the late onset clinical manifestations in these carrier mothers.

This hypothesis is supported by studies on natural myelin mutants with *Plp1* mutations, especially the *jimpy* mouse, modelling severe forms of PMD (Bartlett et Skoff, 1986, 1989) and the *rumpshaker* mouse, modelling SPG2 forms (Fanarraga et al., 1991). Bartlett and Skoff showed that in heterozygous females carrying jimpy mutation, a partial hypomyelination appeared due to a genetic mosaic resulting from random X inactivation. The spinal cord of 15-day-old heterozygous mice exhibited a hypomyelination reflecting of a deficiency of 31% in myelin amount compared to WT mice. However, 1-month-old mice exhibited only a deficiency of 12% that was completely compensated after 5 months of age. The decrease of myelin amount observed early in development was due to an increase in the number of unsheathed axons (without alteration of the total number of axon) and the formation of a thinner myelin sheath. This defect is then corrected with time probably by replacement of dying mutated OLs by normal ones, confirming the existence of compensation and plasticity of neuroglial cells in heterozygous carrier (Bartlett et Skoff, 1986, 1989). At the opposite, heterozygous female mice carrying the rumpshaker mutation first appeared phenotypically normal, but developed some morphological defects worsening with age, mainly in spinal cord, which were not associated with clinical abnormalities. A preliminary study in spinal cord of mice pointed the presence of scattered hypomyelinated axons, a reduced global myelin amount associated with a decrease in PLP immunostaining among axonal fibers (Fanarraga et al., 1991). These results confirm the different expressivity of *Plp1* gene mutations in

female carriers. Regarding Plp null and Plp overexpressed mice, few data are available concerning the neuropathology. However, in Plp null heterozygous mice, a mosaic population of oligodendrocytes has been described in the initial publication (Klugmann et al., 1997). In fact, PLP immunostaining in spinal cord lateral column reveals the coexistence of PLP-positive and PLP-negative axons. In the same way, Griffiths et al. have already described that Plp null heterozygote mice are mosaics in which a proportion of oligodendrocytes express the WT allele and others express the mutant allele, due to random inactivation of genes on the X chromosome (Griffiths et al., 1998b). Besides, all optic nerve axons in Plp null heterozygous mice are normally enwrapped with about 50% of internodes surrounded by PLP-deficient myelin. Furthermore, heterozygous mice exhibit all the morphological signs of axonal swelling and degeneration, although less frequently than in PLP hemizygous mice. Thus in these mice, WT oligodendrocytes were unable to support adjacent axonal segments enwrapped by PLP-deficient myelin and axonal degeneration develop with age. Some others analyses have to be performed to understand the consequences of this mosaicism and the link with the development of behavioural dysfunctions.

Nave recently made the hypothesis that high cognitive functions could be sensitive to defects in oligodendrocytes (Nave, 2010). Because, the brain evolution implies a development of sub-cortical white matter amount, we can assume that myelination is necessary to elaborate high cognitive functions. Notably, in human, myelination of cortical tracts continues until the third decade of life, in parallel with cognitive maturation (Sowell et al., 2003), and even in adults, the acquisition of fine motor capacities is associated with great modifications of white matter in motor cortex areas (Bengtsson et al., 2005). Hence, in leukodystrophies, dysmyelination and reduced conduction velocity in long axons may limit the distance over which cortical neurons can fire in synchrony (Wang et al., 2008). The absence of long range gamma-oscillations (this is a particular high frequency excitation of neurons) between cortical subfields could cause attention deficits (Gregoriou et al., 2009). Myelin defects in long axons can also perturb spike-timing-dependent plasticity which underlies synaptic strengthening or weakening (long term potentiation or long term depression) and possibly long-range circuit refinements (Dan et Poo, 2004). This notion of alteration of conduction velocities and synchronization could be tested by spinal somatosensory evoked potentials on Plp null mice (cortical recording being difficult to perform in mouse).

5. Conclusion

Even if nowadays, few data are available on PLP-pathies transmitter mothers or their animal models, our study present the interest to confirm that these women carrying *PLP1* mutations can exhibit symptoms more or less severe according to the type of carried mutations. To date, it remains much to learn on the comprehension of biological mechanisms leading to physiological and behavioural alterations observed in these mothers. Animal models are precious tools to improve our comprehension and permit eventually to consider treatments.

References

- Anderson TJ, Schneider A, Barrie JA, Klugmann M, McCulloch MC, Kirkham D, Kyriakides E, Nave KA, Griffiths IR (1998) Late-onset neurodegeneration in mice with increased dosage of the proteolipid protein gene. *J Comp Neurol* 394:506–519.
- Bartlett WP, Skoff RP (1986) Expression of the jimpy gene in the spinal cords of heterozygous female mice. 1. An early myelin deficit followed by compensation. *J Neurosci* 6:2802–2812.
- Bartlett WP, Skoff RP (1989) Expression of the jimpy gene in the spinal cords of heterozygous female mice. 2. Oligodendroglial and endothelial cell hyperplasia. *Brain Res Dev Brain Res* 47:1–11.
- Bengtsson SL, Nagy Z, Skare S, Forsman L, Forssberg H, Ullén F (2005) Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nat Neurosci* 8:1148–1150.
- Cailloux F, Gauthier-Barichard F, Mimault C, Isabelle V, Courtois V, Giraud G, Dastugue B, Boespflug-Tanguy O (2000) Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease. *Eur J Hum Genet* 8:837–845.
- Dan Y, Poo M-M (2004) Spike timing-dependent plasticity of neural circuits. *Neuron* 44:23–30.
- Fanarraga ML, Griffiths IR, McCulloch MC, Barrie JA, Cattanaach BM, Brophy PJ, Kennedy PG (1991) Rumpshaker: an X-linked mutation affecting CNS myelination. A study of the female heterozygote. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17:323–334.
- Garbern JY et al. (1997) Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin. *Neuron* 19:205–218.
- Gregoriou GG, Gotts SJ, Zhou H, Desimone R (2009) Long-range neural coupling through synchronization with attention. *Prog Brain Res* 176:35–45.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Thomson C, Vouyiouklis D, Nave KA (1998a) Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microsc Res Tech* 41:344–358.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA (1998b) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280:1610–1613.
- Hodes ME, Blank CA, Pratt VM, Morales J, Napier J, Dlouhy SR (1997) Nonsense mutation in exon 3 of the proteolipid protein gene (PLP) in a family with an unusual form of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Med Genet* 69:121–125.
- Hodes ME, DeMyer WE, Pratt VM, Edwards MK, Dlouhy SR (1995) Girl with signs of Pelizaeus-Merzbacher disease heterozygous for a mutation in exon 2 of the proteolipid protein gene. *Am J Med Genet* 55:397–401.
- Inoue K (2005) PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* 6:1–16.
- Inoue K, Tanaka H, Scaglia F, Araki A, Shaffer LG, Lupski JR (2001) Compensating for central nervous system dysmyelination: females with a proteolipid protein gene duplication and sustained clinical improvement. *Ann Neurol* 50:747–754.

- Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA (1997) Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18:59–70.
- Mandillo S et al. (2008) Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol Genomics* 34:243–255.
- Marble M, Voeller KS, May MM, Stevenson RE, Schwartz CE, Simensen RJ (2007) Pelizaeus Merzbacher syndrome: Neurocognitive function in a family with carrier manifestations. *American Journal of Medical Genetics Part A* 143A:1442–1447.
- Millan MJ, Dekeyne A, Papp M, La Rochelle CD, MacSweeney C, Peglioni JL, Brocco M (2001) S33005, a novel ligand at both serotonin and norepinephrine transporters: II. Behavioral profile in comparison with venlafaxine, reboxetine, citalopram, and clomipramine. *J Pharmacol Exp Ther* 298:581–591.
- Nance MA, Boyadjiev S, Pratt VM, Taylor S, Hodes ME, Dlouhy SR (1996) Adult-onset neurodegenerative disorder due to proteolipid protein gene mutation in the mother of a man with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neurology* 47:1333–1335.
- Nave K-A (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468:244–252.
- Noël J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, Guy N, Borsotto M, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M (2009) The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 28:1308–1318.
- Raskind WH, Williams CA, Hudson LD, Bird TD (1991) Complete deletion of the proteolipid protein gene (PLP) in a family with X-linked Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Hum Genet* 49:1355–1360.
- Readhead C, Schneider A, Griffiths I, Nave KA (1994) Premature arrest of myelin formation in transgenic mice with increased proteolipid protein gene dosage. *Neuron* 12:583–595.
- Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21:801–810.
- Shimizu I, Iida T, Guan Y, Zhao C, Raja SN, Jarvis MF, Cockayne DA, Caterina MJ (2005) Enhanced thermal avoidance in mice lacking the ATP receptor P2X3. *Pain* 116:96–108.
- Sowell ER, Peterson BS, Thompson PM, Welcome SE, Henkenius AL, Toga AW (2003) Mapping cortical change across the human life span. *Nat Neurosci* 6:309–315.
- Wang SS-H, Shultz JR, Burish MJ, Harrison KH, Hof PR, Towns LC, Wagers MW, Wyatt KD (2008) Functional trade-offs in white matter axonal scaling. *J Neurosci* 28:4047–4056.
- Yiu EM, Farrell SA, Soman T (2009) Classic Pelizaeus Merzbacher disease in a girl with an unbalanced chromosomal translocation and functional duplication of PLP1. *Movement Disorders* 24:2171–2172.

DISCUSSION GENERALE

ET

CONCLUSION

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Lorsque ce travail de thèse a débuté, aucune caractérisation du comportement des animaux mutés *Plp1* n'avait été réalisée, mise à part la mise en évidence d'un déficit moteur tardif au test du rotarod chez des souris *Plp* null âgées de 15 à 18 mois selon les publications (Griffiths et al., 1998b; Yin et al., 2006). Nous avons donc réalisé une étude comportementale longitudinale incluant différents tests répétés sur les souris *Plp* null à différents âges, en considérant que ces études qui exigent beaucoup de temps sont particulièrement importantes pour évaluer précisément l'apparition et l'évolution d'altérations comportementales corrélées aux stades neuropathologiques. Les leucodystrophies étant des atteintes génétiques de la myéline, elles ont longtemps été évaluées seulement d'un point de vue moteur. Cependant, ce travail a permis de mettre en évidence des données particulièrement intéressantes en accord avec les descriptions cliniques disponibles, notamment l'existence de troubles sensitifs et cognitifs chez les souris *Plp* null, ainsi que la présence d'anomalies comportementales (hyperactivité et troubles du comportement anxieux) chez les femelles hétérozygotes *Plp* null, modèle de mères transmettrices de SPG2, tandis que les femelles surexprimant *Plp1* se sont avérées asymptomatiques.

Interférences entre anomalies motrices et troubles sensitifs chez les souris *Plp* null ?

Du point de vue des troubles sensitifs identifiés chez les souris *Plp* null, plusieurs hypothèses auraient pu impliquer l'intervention de la sphère motrice dans le comportement de retrait de la queue. En effet, une augmentation de la latence de retrait de la queue pourrait concorder avec des troubles moteurs. Cependant, les souris *Plp* null présentent, d'une part, une diminution précoce, dès 3 mois, de la latence de retrait de la queue, et d'autre part, des anomalies motrices (hyperlocomotion, troubles de la force musculaire) ne survenant qu'aux environs de 9 mois. Ces données permettent ainsi d'exclure l'influence de troubles moteurs sur le comportement de retrait. D'autre part, cette diminution de latence de retrait de la queue chez les souris *Plp* null pourrait être liée à un phénomène d'hyperréflexie. L'hyperréflexie est un exemple de régulation anormale du réflexe segmental associée à une lésion de la moelle épinière. Théoriquement, l'hyperréflexie résulterait d'une altération des mécanismes inhibiteurs, une hyperexcitabilité des neurones moteurs alpha et une augmentation d'activité des fibres gamma. Il semblerait que l'hyperréflexie soit liée à des modifications physiologiques, telles que l'augmentation de la fréquence cardiaque ou de la température corporelle, mais également liée à des modifications électrophysiologiques, telles qu'une altération de la dépression de l'onde réflexe H dépendante de la fréquence de stimulation

(Yates et al., 2008). Dans notre étude, les souris Plp null ne présentent aucune anomalie de température corporelle, ni d'anomalie d'atténuation de l'onde H dépendante de la fréquence de stimulation, comparés aux souris sauvages, excluant très probablement le phénomène d'hyperréflexie dans le comportement de retrait de la queue des souris Plp null.

Interférences entre anomalies motrices et fonctions cognitives chez les souris Plp null ?

Chez les rongeurs, l'évaluation des fonctions plus évoluées, telles que les fonctions cognitives, est basée principalement sur la réponse comportementale motrice, contrairement à l'évaluation chez l'Homme qui utilise également le langage. Chez le rongeur, il est alors possible qu'il y ait des interférences dans l'analyse entre les sphères motrices et cognitives. Cependant, dans notre étude, il semble que les altérations motrices identifiées chez les souris Plp null, n'influencent pas l'évaluation des fonctions plus évoluées. En effet, il apparaît que la diminution de la force musculaire chez les souris Plp null, ne provoque pas de réduction de l'activité locomotrice qui aurait pu être à l'origine de mauvaises performances aux tests comportementaux comparées aux souris sauvages.

De plus, on a pu constater lors de l'étude du comportement mnésique des souris Plp null, une altération importante de la mémoire de travail, tandis que la mémoire épisodique est conservée. Une hypothèse suggérerait l'implication de l'hyperactivité comportementale identifiée chez les souris Plp null, pour expliquer la dissociation entre les deux types de mémoire. En effet, cette hyperlocomotion n'induirait pas d'interférences dans les tests de mémoire impliquant une acquisition (mémoire épisodique), mais interférerait avec une mémoire à encodage rapide (mémoire de travail). Il pourrait également résulter de cette hyperlocomotion, un problème d'attention pouvant expliquer les résultats obtenus. Cependant, s'il s'agissait exclusivement d'une altération des processus attentionnels, on observerait d'importantes anomalies lors d'autres évaluations comportementales, telles que le test de reconnaissance d'objet ou le test de sociabilité, tests pour lesquels les souris Plp null n'ont toutefois présenté aucune altération.

Des substrats biologiques qui sous-tendent les anomalies sensitives

Nous avons ensuite mis en place des études anatomo-pathologiques pour identifier les substrats neurobiologiques liés aux altérations comportementales. La caractérisation comportementale très détaillée ayant nécessité beaucoup de temps, ce second travail n'a pu être mené à son terme que pour l'investigation des troubles sensitifs chez les souris Plp null.

Pour rappel, l'information sensitive s'intègre à trois niveaux : au niveau périphérique, au niveau de la corne dorsale de la ME et au niveau central. Etant donné les importantes atteintes

de la ME dans la pathologie étudiée, la paraplégie spastique, nous nous sommes particulièrement intéressé à analyser la corne dorsale. Cependant, les deux autres niveaux d'intégration de la douleur resteront intéressants à étudier dans un second temps. Nous avons ainsi pu mettre en évidence d'importantes altérations des conductions nerveuses centrales et périphériques associées à des anomalies d'expression de marqueurs impliqués dans la douleur au niveau de la corne dorsale de la ME, dont certaines sont présentes dès l'âge de 3 mois. Ces travaux suggèrent qu'avant même que la dysmyélinisation ou la dégénérescence axonale soit mise en évidence chez ces souris, l'absence de PLP pourrait conduire à une altération de l'intégration des stimuli douloureux au niveau de la corne dorsale de la ME et provoquer l'hyperalgésie thermique observée dès l'âge de 3 mois.

Cependant, il nous reste encore à comprendre la réelle implication de la microglie et des astrocytes dans l'apparition des troubles sensitifs chez les souris *Plp* null. Pour répondre à ces questions, une demande de financement a été déposée à l'appel d'offre de l'association européenne contre les leucodystrophies (ELA), en juin 2012 par le Pr. Boespflug-Tanguy. Ce projet a pour but, tout d'abord, de mieux caractériser le profil et l'évolution temporelle des comportements sensitifs chez la souris *Plp* null, puis dans un deuxième objectif d'évaluer l'implication des cellules gliales dans les troubles sensitifs en analysant tout particulièrement la communication neuro-gliale qui peut avoir une implication dans le développement de la sensibilisation spinale. La disponibilité de modulateurs moléculaires de l'activation gliale permet d'envisager l'évaluation de leur efficacité sur la modification des altérations sensitives. Enfin, dans un troisième objectif, les voies cellulaires autres que l'activation gliale intervenant dans le développement de la sensibilisation spinale pourront être évaluées en utilisant une stratégie pharmacologique qui permettra de confronter des voies cellulaires spécifiques, par exemple la transmission sérotoninergique en utilisant des antidépresseurs, ou la voie GABAergique en utilisant des drogues antiépileptiques.

Les données sur les douleurs neuropathiques ont permis de mettre en évidence l'intervention des cellules non-neuronales jouant un rôle actif ou exacerbant la signalisation inter-neuronale dans les conditions pathologiques (Cao et Zhang, 2008). Certains éléments suggèrent une contribution, voire un rôle essentiel, des cellules gliales dans certains états douloureux. De nombreux candidats entraîneraient des altérations de la réponse gliale, notamment le glutamate, la substance P, le BDNF, mais également l'ATP ou des chimiokines neuronales. L'ATP a un rôle particulièrement important dans les processus douloureux après lésion nerveuse, mais la nature des récepteurs impliqués n'est pas encore claire, certains suggérant l'intervention des récepteurs P2X4 ou P2X7 microgliaux et du récepteur métabotrope P2Y12 (Zhang et al., 2008b; Cao et Zhang, 2008). Un intérêt tout particulier s'est d'abord

porté sur P2X4 suggérant que son activation dans la microglie n'est pas seulement nécessaire mais suffisante pour induire une allodynie mécanique probablement en permettant la libération de BDNF (Zhang et al., 2008b; Cao et Zhang, 2008). Par la suite, il a été montré que l'activation des récepteurs P2X7 induit la libération de cytokines provenant de la microglie (Cao et Zhang, 2008). Enfin, l'activation microgliale des récepteurs P2Y12 a récemment montré une implication dans le développement de la douleur (Cao et Zhang, 2008). Nous pouvons ainsi suggérer que la signalisation de l'ATP (au travers de ses récepteurs P2X4, P2X7 ou P2Y12) pourrait être impliquée dans le développement de la sensibilité à la douleur chez les souris Plp null.

Les chimiokines, CCL2 et fractalkine (FKN), sont deux autres candidats importants pour les communications neuro-gliales. CCL2 est exprimé *de novo* dans les neurones sensoriels endommagés dans de nombreux modèles de douleur neuropathique. FKN est, quant à elle, une protéine transmembranaire exprimée dans le corps cellulaire des ganglions de la racine dorsale et les neurones de la corne dorsale. L'activation de son récepteur, CX3CR1, uniquement exprimé dans la microglie de la corne dorsale, a des propriétés pro-nociceptives (Old et Malcangio, 2012). Il serait donc intéressant de réaliser une description immunohistochimique plus complète afin de vérifier la distribution des récepteurs purinergiques, du BDNF, des chimiokines et de leurs récepteurs dans la ME et les ganglions des racines dorsales des souris Plp null.

Tandis que l'implication de la glie dans les modèles neuropathiques est largement étudiée, les évaluations de la douleur neuropathique dans des modèles animaux présentant des anomalies gliales sont limitées et concerne très rarement les modèles génétiques de démyélinisation (Zhang et al., 2008b; Thibault et al., 2011), ce qui apporte un intérêt tout particulier à ce travail.

Des substrats biologiques qui sous-tendent les anomalies cognitives

Concernant les troubles cognitifs des mâles Plp null, nous avons déjà pu identifier des anomalies développementales au niveau de transcrits impliqués dans la neurogenèse et certains systèmes de neurotransmission grâce aux études de qRT-PCR. Nous avons ensuite validé les anomalies d'expression de certains de ces marqueurs, en immunohistochimie, sur une structure cérébrale d'intérêt qui est l'hippocampe, structure à la fois impliquée dans les processus mnésiques et d'attention, deux fonctions particulièrement altérées chez les souris Plp null. Cependant, d'autres structures pourraient s'avérer particulièrement intéressantes comme l'amygdale, fortement impliquée dans l'anxiété, et le CPF, impliqué dans l'attention et participant aux processus mnésiques.

Nous avons également évalué en qRT-PCR l'expression de marqueurs spécifiques des pathologies démyélinisantes tels que GFAP, ou encore MBP et Iba1 (actuellement en cours d'analyse), dont nous avons ensuite pu vérifier les variations d'expression dans l'hippocampe. On peut noter que ces études anatomo-pathologiques ont révélé un résultat surprenant quant aux profils d'expression de GFAP, fortement augmenté dans la ME et le cerveau total, et diminué dans l'hippocampe. Il semble donc que le processus d'astrogliose, fréquemment associé aux pathologies neurodégénératives, ne soit pas généralisé à toutes les structures cérébrales dans notre modèle de SPG2.

Les analyses qRT-PCR ont également mis en évidence des variations d'expressions d'un gène codant pour une protéine de liaison au calcium, *s100a6*, à tous les âges testés chez les souris Plp null, avec une sous-expression à 15 jours et une sur-expression à 3 et 15 mois. La protéine S100A6 est particulièrement abondante dans les fibroblastes et les cellules épithéliales, mais on la retrouve également dans certains neurones et cellules gliales. Il apparaît que la fixation de S100A6 à ses cibles pourrait entrer en compétition ou interrompre les interactions protéines-protéines établies et par conséquent moduler de nombreux processus cellulaires de manière calcium-dépendante (Spiechowicz et al., 2007; Shimamoto et al., 2008). L'expression de S100A6 peut augmenter dans des conditions de stress, telles qu'une ischémie, une force mécanique, une irradiation ou un stress oxydatif (Leśniak et al., 2009). Une forte augmentation de l'expression de S100A6 peut être une indication du processus d'astrogliose retrouvé dans les pathologies neurodégénératives et peut être caractéristique d'une altération des axones des motoneurones, comme la montré une étude sur des patients et des modèles animaux de sclérose latérale amyotrophique (Hoyaux et al., 2002; Leśniak et al., 2009). Dans notre étude, il nous reste cependant à valider de façon immunohistochimique sur des coupes de cerveau, les variations d'expression de *s100a6* mis en évidence en qRT-PCR.

Concernant les anomalies d'expression des marqueurs GABAergiques, comme *Gabrb2* et *Gabbr2*, identifiées en qRT-PCR chez les souris Plp null, il est également nécessaire de compléter les résultats par une étude immunohistochimique. Ne disposant pas des anticorps primaires de tous les marqueurs ayant présenté des anomalies en qRT-PCR, notamment les récepteurs GABAergiques, nous avons débuté les analyses immunohistochimiques en regardant si l'organisation générale de l'hippocampe en terme de sous populations neuronales GABAergiques était conservé chez les souris Plp null. Nous avons ainsi examiné l'expression de différentes protéines de transport du calcium :

- la parvalbumine, exprimée dans certaines cellules en panier ou en chandelier.
- la calretinine (actuellement en cours d'analyse) exprimée dans la catégorie des interneurones innervant les autres interneurones et dans les neurones en épines.

- la calbindine exprimée dans les cellules principales (fibres moussues, cellules pyramidales de l'aire CA1, cellules granulaires du gyrus denté et quelques cellules du *stratum radiatum* de l'aire CA3, proches de la lame supérieure du gyrus denté) et les interneurons de la formation hippocampique, sauf les cellules en panier et en chandelier (Tóth et Freund, 1992; Freund et Buzsáki, 1996).

Les résultats des quantifications ont montré une absence d'anomalie d'expression de la parvalbumine et la calretinine dans l'hippocampe des souris Plp null. De même l'analyse de l'expression de la calbindine a montré une absence de différence entre les génotypes dans la zone cellulaire externe du gyrus denté (zone I.1 correspondant à la zone granulaire) présentant une expression à la fois GABAergique et glutamatergique, et également dans la zone cellulaire interne du gyrus denté (zone I.2 correspondant à la couche polymorphique) présentant uniquement une expression GABAergique. La quantification dans la zone du *stratum radiatum* de l'aire CA3 (zone II présentant une expression GABAergique, l'expression glutamatergique étant uniquement dans la lame supérieure où nous n'avons pas réalisé la quantification) a, quant à elle, montré une diminution de l'expression de la calbindine. D'autre part, nous n'avons pas identifié d'anomalie d'expression du marqueur neuronal NeuN dans l'hippocampe des souris Plp null. Tous ces résultats suggèrent, d'une part, que l'organisation générale de l'hippocampe est relativement conservée, mais également que la diminution d'expression de la calbindine pourrait avoir des conséquences sur les fonctions hippocampiques chez ces souris.

Enfin, étant donné les variations d'expression en qRT-PCR de gènes codant des récepteurs cholinergiques tels que *Chrna1*, sur-exprimé à 15 jours et sous-exprimé à 15 mois chez les souris Plp null, il serait intéressant d'analyser en immunohistochimie, les différents récepteurs cholinergiques. Cependant, ne disposant pas d'anticorps spécifiques des sous-types de récepteurs, il est envisagé d'identifier dans un premier temps les variations d'expression de l'enzyme de synthèse, la choline-acétyl-transférase, et/ou de l'enzyme de destruction, l'acétylcholinestérase, afin de déterminer de potentielles altérations du métabolisme cholinergique chez les souris Plp null.

Implication de la neurogenèse et la plasticité synaptique dans les processus cognitifs

Le cerveau adulte contient des cellules souches neurales (NSC) qui s'auto-renouvellent, prolifèrent et donne naissance à des cellules progénitrices neurales (NPC). Ces NPC vont ensuite proliférer et se différencier pour donner lieu à de nouveaux neurones et cellules gliales. Ces NSC sont reconnus pour avoir une importance fonctionnelle et possèdent un potentiel de réparation dans un cerveau lésé (Lazarov et al., 2010). Il existe deux zones

neurogènes dans le cerveau adulte : (1) la zone sous-ventriculaire (SVZ) attenante aux ventricules latéraux, qui contient les NSC donnant les neurones du bulbe olfactif, et (2) la couche sous-granulaire (SGL) dans le gyrus denté de l'hippocampe, où les NSC deviennent des neurones granulaires. Dans la SGL et la SVZ, les neurones nouvellement formés vont avoir des caractéristiques physiologiques bien distinctes qui peuvent contribuer à la plasticité comportementale et du cerveau. Des cellules de la SVZ sont à l'origine de cellules progénitrices intermédiaires (IPs ou NPCs) qui donnent à leur tour des neuroblastes exprimant PSA-NCAM (pour « polysialated neural cell adhesion molecule ») et doublecortine (Lazarov et al., 2010).

Les études comportementales ont longtemps suggéré que la formation hippocampique (association du gyrus denté, des aires CA1, CA2 et CA3 de l'hippocampe et du subiculum) jouait un rôle critique dans l'apprentissage et la mémoire, qui dépendent de changements fonctionnels et structuraux, tels que la PLT ou le remodelage synaptique. La découverte d'une production de neurones *de novo* dans le gyrus denté adulte a introduit par la suite le concept d'une nouvelle forme de plasticité qui pourrait soutenir les processus mnésiques (Mu et Gage, 2011). Pour examiner de potentielles anomalies des processus de neurogenèse chez les souris Plp null, nous prévoyons donc de réaliser une analyse immunohistochimique avec un marquage des cellules exprimant doublecortine sur des coupes d'hippocampe.

Enfin, étant donné le rôle important des cellules NG2 (nerve/glial antigen 2), cellules classiquement décrites comme des OPCs, car elles donnent naissance à la majorité, si ce n'est tous, les OLs du cerveau adulte (Trotter et al., 2010; Mangin et Gallo, 2011), il serait intéressant de vérifier leur expression dans le cerveau de souris Plp null. Il apparaît que les cellules NG2 représentent la population cellulaire la plus proliférative du cerveau postnatal et adulte, à la fois dans la SG et la SB. Cependant, certaines hypothèses suggèrent d'autres fonctions importantes pour ces cellules dans le cerveau. Parce que les synapses établies entre les cellules NG2 et les neurones se forment quand les axones sont encore non-myélinisés, et sont perdus quand les cellules NG2 se différencient en OLs, il semblerait que la fonction de ces synapses serait liée au rôle des cellules NG2 pendant la myélinisation (Mangin et Gallo, 2011). Les cellules NG2 sont générées 2 ou 3 semaines avant le début de la myélinisation, suggérant leur rôle dans les phases précoces du développement post-natal. Il est possible que les cellules NG2 exercent une influence précoce sur la croissance axonale, l'orientation et la formation des synapses pendant le développement du SNC. Dans les conditions normales ou pathologiques, les cellules NG2 pourraient donc participer à réguler les connectivités entre les diverses aires cérébrales. D'autre part, les cellules NG2 répondent à la libération neuronale de

glutamate et de GABA. Cette interaction neurone/glie pourrait ainsi réguler la différenciation et la prolifération des cellules NG2 (Trotter et al., 2010; Mangin et Gallo, 2011).

La capacité des neurones à moduler la force de transduction du signal synaptique dans la PLT, est une des caractéristiques de la plasticité synaptique. La découverte selon laquelle les cellules NG2⁺ peuvent présenter la PLT (Ge et al., 2006) permet de les intégrer dans le réseau neuronal. La PLT est considérée comme le mécanisme cellulaire sous-jacent des processus d'apprentissage et de mémoire, et est associée à une réorganisation des structures synaptiques. Si un mécanisme similaire survient dans les OPCs, ces cellules pourraient réagir à des signaux neuronaux altérés et finalement contribuer aux hautes fonctions cérébrales (Sakry et al., 2011).

Parce que les cellules NG2 ont un rôle fondamental dans les pathologies de la myéline et la régénérescence axonale après lésion cérébrale, il est important d'examiner leur expression dans le cerveau, et notamment l'hippocampe, des souris *Plp* null.

Le cas des mères transmettrices de *Plp*-pathies

L'hypothèse de travail concernant les mères transmettrices est que les mères hétérozygotes possèderaient deux populations d'OLs, 50% possédant l'allèle sauvage et 50% possédant l'allèle muté. Dans le cas de mutations à l'origine de phénotypes sévères, les OLs mutants seraient éliminés par apoptose et il se produirait ensuite un phénomène de compensation permettant aux OLs sauvages de proliférer et de devenir ainsi la population majoritaire expliquant l'absence de symptôme chez ces mères transmettrices. Dans le cas de mutations à l'origine de phénotypes modérés chez les garçons, les OLs mutants survivraient et les deux populations d'OLs, mutants et sauvages, participeraient à la formation d'une gaine de myéline en mosaïque, plus fragile qui se dégraderait au cours du temps, pouvant expliquer la démyélinisation tardive et les troubles comportementaux observés chez ces mères transmettrices (Inoue et al., 2001; Inoue, 2005). Nous n'avons pour le moment, pas encore vérifié cette hypothèse grâce à des études d'anatomo-pathologie sur nos modèles souris, mais des données de la littérature vont dans ce sens. En effet, une étude réalisée sur des mutants souris hétérozygotes *jimpy* et *rumpshaker*, a montré que la proportion d'OLs exprimant les allèles mutants diminue en comparaison des OLs sauvages, mais tandis que ceux exprimant la mutation *rumpshaker* forment une population réduite mais stable, le nombre de cellules *jimpy* se réduit progressivement. La survie des OLs ne semble ainsi pas être déterminée uniquement par des facteurs intrinsèques, tels que la conformation non repliée de PLP, mais serait influencée par les cellules avoisinantes, peut-être en compétition pour les facteurs de survie cellulaire (Edgar et al., 2002b).

Nos résultats comportementaux appuient également cette hypothèse, avec l'apparition d'importants troubles comportementaux uniquement chez les souris hétérozygotes *Plp* null. L'analyse anatomo-pathologique est ici également nécessaire pour comprendre d'où viennent ces anomalies et si les souris présentent des signes importants de démyélinisation et de dégénérescence axonale.

Aux vues des troubles cognitifs observés chez les femelles *Plp* null, assez comparables à ceux observés chez les mâles hémizygotés, nous prévoyons de mettre en place une analyse similaire. Cependant, les souris femelles hétérozygotes *Plp* null présentent une absence de troubles moteurs (force musculaire non altérée), des troubles cognitifs plus sévères (mémoire de travail et hyperactivité comportementale plus affectées) et des anomalies sensibles moins marquées, comparés aux mâles *Plp* null. Étant donné ces différences, on peut alors s'interroger si une similarité complète des données anatomo-pathologiques entre mâles et femelles. Cette analyse comparative permettrait de vérifier si la présence de quelques OLS n'exprimant pas PLP aurait des conséquences plus délétères sur la cognition que la totalité des OLS n'exprimant pas PLP. On pourrait alors suggérer qu'il se produirait un phénomène de compensation dans le cas d'une délétion complète de PLP, expliquant la différence de phénotypes entre mâle *Plp* null homozygotes et femelles *Plp* null hétérozygotes.

D'après nos premiers résultats, il apparaît cependant déjà que les souris femelles hétérozygotes *Plp* null et PLOA semblent être de bons modèles de la pathologie humaine, puisque tout comme pour les mères porteuses de mutations de *PLP1*, les souris présentant une absence partielle de PLP développent d'importantes anomalies comportementales, tandis que les souris surexprimant PLP semblent asymptomatiques, tout comme les mères présentant des duplications de *PLP1*. Ces premiers résultats laissent déjà présager l'importance de ces modèles animaux dans la compréhension de la physiopathologie des *Plp*-pathies.

Les souris *Plp* null pour le développement thérapeutique

L'objectif primordial de toutes ces caractérisations phénotypiques sur ces modèles souris était clairement d'identifier des marqueurs permettant d'évaluer des stratégies thérapeutiques intéressantes dans ces pathologies, qui jusqu'à aujourd'hui ne disposent pas de traitement efficace. Du fait de l'avancement des connaissances sur les mâles hémizygotés *Plp* null grâce à ce travail, nous avons pu envisager la mise en place d'un essai thérapeutique en évaluant l'efficacité d'un neuroleptique atypique, la risperidone, sur les troubles comportementaux. Nous nous sommes intéressés au potentiel thérapeutique de ce composé pour deux raisons ; (1) cette drogue est parfois utilisée en clinique chez des patients SPG2 sans rationnel physiopathologique, (2) elle a déjà prouvé son efficacité sur l'hyperactivité et certains

troubles cognitifs observés dans la schizophrénie, mais également dans des modèles induits de démyélinisation. Dans notre étude, ce traitement a montré une efficacité sur l'hyperactivité des souris sans effets secondaires notables pour la dose testée la plus élevée. Ces résultats sont intéressants, mais nous cherchons encore à identifier une drogue plus appropriée et plus efficace, que ce soit à partir de composés déjà utilisés en clinique, comme d'autres neuroleptiques atypiques, antidépresseurs ou antiépileptiques, ou de composés en cours de développement préclinique. Les leucodystrophies sont des pathologies rares pour lesquelles l'investissement des entreprises privées, afin de développer de nouveaux médicaments, reste très faible. Afin d'avoir un transfert rapide vers la clinique, il est donc intéressant de se tourner vers des molécules déjà commercialisées et dont les analyses de toxicologie n'ont pas montré de contre-indication pour les enfants.

D'autre part, en plus de l'intérêt de traitements visant à améliorer la qualité de vie des patients (traitements symptomatiques), le développement thérapeutique s'axe également vers des traitements curatifs. Depuis deux ans, le Pr O. Boespflug-Tanguy coordonne le projet européen « Leukotreat », financé par la commission européenne dans le cadre du 7^{ème} programme d'encadrement pour la recherche et le développement. Le projet a pour objectif le développement de stratégies thérapeutiques pour différentes leucodystrophies. Concernant la PMD/SPG2, notre équipe participe à 2 projets : (1) le développement d'une stratégie de thérapie génique pour les souris sur-exprimant *Plp1*, visant à diminuer cette surexpression en utilisant la technologie des morpholinos oligonucléotides antisens (Moulton, 2007), (2) l'évaluation sur nos modèles souris de PMD et SPG2, d'une drogue, l'olesoxime, développée par la société Trophos et ayant montré un effet neuroprotecteur dans des pathologies du motoneurone (Bordet et al., 2007; Sunyach et al., 2012), ainsi qu'un effet re-myélinisant dans différents modèles de démyélinisation (Magalon et al., 2012).

Historiquement, les protéolipoprotéines ont été décrites comme des protéines majeures de la structure de la myéline, et les anomalies d'expression du gène *PLP1* en pathologie humaine ont été reliées à un défaut de quantité de myéline (mutations gain de fonction associées au phénotype PMD) ou de compaction de la myéline (mutations nulles associées au phénotype SPG2). Au cours des dernières années, la découverte de tableaux de patients SPG2 avec dégénérescence axonale prédominante en lien avec des mutations de *PLP1*, la description d'une atteinte neuronale chez les patients PMD et les premières études physiopathologiques chez les différents modèles animaux ont fait suggérer des fonctions plus complexes pour PLP que celle de simple protéine structurelle de la myéline dans les oligodendrocytes.

Chez les souris, un épissage alternatif de l'exon 1.1 du gène *Plp1* code également deux isoformes protéiques restreintes au soma, sr-PLP et sr-DM20, exprimées à la fois dans les OLs et les neurones, et associées au trafic/recyclage des vésicules endocytaires (Bongarzone et al., 1999; Miller et al., 2009). Les nouvelles données montrant une activation du promoteur de *Plp1* et une expression de sr-PLP dans un sous-type neuronal du néostriatum en développement, les neurones en épines, ont plusieurs implications importantes. Premièrement, cela donne une crédibilité à l'identification d'une accumulation de sr-PLP dans cette large sous-population de neurones matures, ce qui indique que l'expression du gène *Plp1* se maintient dans certains phénotypes neuronaux et y joue un rôle au cours du développement. A l'intérieur même du néostriatum, les différences entre les neurones en épines (avec une expression de sr-PLP) et les neurones larges non épineux (sans expression de sr-PLP) pourraient aider à résoudre certains rôles des isoformes PLP dans le trafic/recyclage endocytaire, l'échange d'ions, et/ou les processus de développement. Deuxièmement, Les neurones en épines du néostriatum synthétisent le GABA, une caractéristique que ne possèdent pas les neurones néocorticaux du tronc cérébral et de l'hypothalamus, ayant également montré une expression du gène *Plp1*. Ceci suggère que l'expression de *Plp1* n'est pas restreinte à des neurones exprimant des neurotransmetteurs excitateurs ou inhibiteurs. Enfin, les neurones en épines émettent des projections myélinisées et des axones collatéraux locaux non-myélinisés, suggérant que leur expression du gène *Plp1* n'est pas impliquée uniquement dans le phénomène de myélinisation. Dans ce contexte, les neurones pourraient être une cause pathologique primaire dans certaines pathologies neurologiques humaines associées à des mutations du gène *PLP1* (Fulton et al., 2010). Des études de tissus *post-mortem* ont ainsi montré une importante perte neuronale chez des patients PMD (Sima et al., 2009). De la même façon, des formes similaires de dégénérescence des neurones de projection du néostriatum ont été mises en évidence chez des patients SPG2 (Saugier-Weber et al., 1994).

Etant donné l'intérêt grandissant pour définir le rôle de la SB, et plus particulièrement de la myéline, dans les fonctions comportementales, ces modèles murins de leucodystrophies dysmyélinisantes constituent un modèle intéressant pour comprendre ce rôle et envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. En caractérisant plus précisément l'apparition d'anomalies phénotypiques chez les souris mutées *Plp1*, ce travail de thèse renforce l'hypothèse proposée par K.A Nave, selon laquelle les fonctions cognitives seraient sensibles aux altérations des OLs et donc à un défaut de myélinisation.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdi S, Lee DH, Chung JM (1998) The anti-allodynic effects of amitriptyline, gabapentin, and lidocaine in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesia & Analgesia* 87:1360-1366.
- Aicher SA, Silverman MB, Winkler CW, Bebo BF Jr (2004) Hyperalgesia in an animal model of multiple sclerosis. *Pain* 110:560-570.
- Amaral D, Price J, Pitkanen A, Carmichael S (1992) Anatomical organization of the primate amygdaloid complex In *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction* New York: Wiley-Liss, p. Chapter 1, pp. 1-66.
- Anderson TJ, Klugmann M, Thomson CE, Schneider A, Readhead C, Nave KA, Griffiths IR (1999) Distinct phenotypes associated with increasing dosage of the PLP gene: implications for CMT1A due to PMP22 gene duplication. *Ann N Y Acad Sci* 883:234-246.
- Anderson TJ, Schneider A, Barrie JA, Klugmann M, McCulloch MC, Kirkham D, Kyriakides E, Nave KA, Griffiths IR (1998) Late-onset neurodegeneration in mice with increased dosage of the proteolipid protein gene. *J Comp Neurol* 394:506-519.
- Arezzo JC, Litwak MS, Zotova EG (2011) Correlation and dissociation of electrophysiology and histopathology in the assessment of toxic neuropathy. *Toxicol Pathol* 39:46-51.
- Arroyo EJ, Scherer SS (2000) On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochemistry* 113:0001.
- Aston C, Jiang L, Sokolov BP (2005) Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 10:309-322.
- Baddeley A (2012) Working memory: theories, models, and controversies. *Annu Rev Psychol* 63:1-29.
- Bannerman DM, Rawlins JNP, McHugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T, Zhang W-N, Pothuizen HHJ, Feldon J (2004) Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28:273-283.
- Barili P, De Carolis G, Zaccheo D, Amenta F (1998) Sensitivity to ageing of the limbic dopaminergic system: a review. *Mech Ageing Dev* 106:57-92.
- Baron R (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2:95-106.
- Le Bars D, Adam F (2002) Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain. *Ann Fr Anesth Reanim* 21:315-335.
- Le Bars D, Willer J-C (2004) Physiologie de la douleur. *EMC - Anesthésie-Réanimation* 1:227-266.
- Bartlett WP, Knapp PE, Skoff RP (1988) Glial conditioned medium enables jimpy oligodendrocytes to express properties of normal oligodendrocytes: production of myelin antigens and membranes. *Glia* 1:253-259.
- Bartlett WP, Skoff RP (1986) Expression of the jimpy gene in the spinal cords of heterozygous female mice. I. An early myelin deficit followed by compensation. *J Neurosci* 6:2802-2812.
- Bartlett WP, Skoff RP (1989) Expression of the jimpy gene in the spinal cords of heterozygous female mice. 2. Oligodendroglial and endothelial cell hyperplasia. *Brain Res Dev Brain Res* 47:1-11.
- Bartzokis G (2005) Brain myelination in prevalent neuropsychiatric developmental disorders: primary and comorbid addiction. *Adolesc Psychiatry* 29:55-96.
- Bartzokis G (2011) Alzheimer's disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown. *Neurobiol Aging* 32:1341-1371.
- Bauer J, Bradl M, Klein M, Leisser M, Deckwerth TL, Wekerle H, Lassmann H (2002) Endoplasmic reticulum stress in PLP-overexpressing transgenic rats: gray matter oligodendrocytes are more vulnerable than white matter oligodendrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:12-22.
- Bekku Y, Rauch U, Ninomiya Y, Oohashi T (2009) Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS. *J Neurochem* 108:1266-1276.
- Benarroch EE (2009) Oligodendrocytes: Susceptibility to injury and involvement in neurologic disease. *Neurology* 72:1779-1785.

- Bennett AD, Chastain KM, Hulsebosch CE (2000) Alleviation of mechanical and thermal allodynia by CGRP(8-37) in a rodent model of chronic central pain. *Pain* 86:163-175.
- Bernard G, Chouery E, Putorti ML, Tétreault M, Takanohashi A, Carosso G, Clément I, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Delague V, Abou Ghoch J, Jalkh N, Dorboz I, Fribourg S, Teichmann M, Megarbane A, Schiffmann R, Vanderver A, Brais B (2011) Mutations of POLR3A encoding a catalytic subunit of RNA polymerase Pol III cause a recessive hypomyelinating leukodystrophy. *Am J Hum Genet* 89:415-423.
- Berrocso E, Mico J-A, Vitton O, Ladure P, Newman-Tancredi A, Depoortère R, Bardin L (2011) Evaluation of milnacipran, in comparison with amitriptyline, on cold and mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology* 655:46-51.
- Beyer MK, Aarsland D, Greve OJ, Larsen JP (2006) Visual rating of white matter hyperintensities in Parkinson's disease. *Mov Disord* 21:223-229.
- Biancheri R, Zara F, Rossi A, Mathot M, Nassogne MC, Yalcinkaya C, Erturk O, Tuysuz B, Di Rocco M, Gazzero E, Bugiani M, van Spaendonk R, Sistermans EA, Minetti C, van der Knaap MS, Wolf NI (2011) Hypomyelination and congenital cataract: broadening the clinical phenotype. *Arch Neurol* 68:1191-1194.
- Del Bigio MR (2010) Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:55-73.
- Billings-Gagliardi S, Kirschner DA, Nadon NL, DiBenedetto LM, Karthigasan J, Lane P, Pearsall GB, Wolf MK (1995) Jimpy 4J: a new X-linked mouse mutation producing severe CNS hypomyelination. *Dev Neurosci* 17:300-310.
- Biton IE, Duncan ID, Cohen Y (2006) High b-value q-space diffusion MRI in myelin-deficient rat spinal cords. *Magn Reson Imaging* 24:161-166.
- Biton IE, Duncan ID, Cohen Y (2007) q-Space diffusion of myelin-deficient spinal cords. *Magn Reson Med* 58:993-1000.
- Bizzozero OA, Bixler HA, Davis JD, Espinosa A, Messier AM (2001) Chemical deacylation reduces the adhesive properties of proteolipid protein and leads to decompaction of the myelin sheath. *J Neurochem* 76:1129-1141.
- Boespflug-Tanguy O, Labauge P, Fogli A, Vaurs-Barrière C (2008) Genes involved in leukodystrophies: a glance at glial functions. *Curr Neurol Neurosci Rep* 8:217-229.
- Bohnen NI, Albin RL (2011) White matter lesions in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 7:229-236.
- Boison D, Stoffel W (1989) Myelin-deficient rat: a point mutation in exon III (A---C, Thr75---Pro) of the myelin proteolipid protein causes dysmyelination and oligodendrocyte death. *EMBO J* 8:3295-3302.
- Boison D, Stoffel W (1994) Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11709-11713.
- Bongarzone ER, Campagnoni CW, Kampf K, Jacobs EC, Handley VW, Schonmann V, Campagnoni AT (1999) Identification of a new exon in the myelin proteolipid protein gene encoding novel protein isoforms that are restricted to the somata of oligodendrocytes and neurons. *J Neurosci* 19:8349-8357.
- Bonnet-Dupeyron M-N, Combes P, Santander P, Cailloux F, Boespflug-Tanguy O, Vaurs-Barrière C (2008) PLP1 splicing abnormalities identified in Pelizaeus-Merzbacher disease and SPG2 fibroblasts are associated with different types of mutations. *Hum Mutat* 29:1028-1036.
- Bordet T, Buisson B, Michaud M, Abitbol J-L, Marchand F, Grist J, Andriambeloson E, Malcangio M, Pruss RM (2008) Specific antinociceptive activity of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622) in experimental models of painful diabetic and chemotherapy-induced neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 326:623-632.
- Bordet T, Buisson B, Michaud M, Drouot C, Galéa P, Delaage P, Akentieva NP, Evers AS, Covey DF, Ostuni MA, Lacapère J-J, Massaad C, Schumacher M, Steidl E-M, Maux D, Delaage M, Henderson CE, Pruss RM (2007) Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* 322:709-720.
- de Bot ST, van de Warrenburg BPC, Kremer HPH, Willemsen MAAP (2010) Child neurology: hereditary spastic paraplegia in children. *Neurology* 75:e75-79.
- Bouhassira D (2008) [Definition and classification of neuropathic pain]. *Presse Med* 37:311-314.
- Bureau F (2011) La somesthésie In *Neurophysiologie: De la physiologie à l'exploration fonctionnelle* Paris: Elsevier, p. 43-52.

- Bourin M, Petit-Demoulière B, Dhonnchadha BN, Hascöet M (2007) Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 21:567-574.
- Bradesi S (2010) Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception. *Neurogastroenterol Motil* 22:499-511.
- Bradl M, Bauer J, Inomata T, Zielasek J, Nave KA, Toyka K, Lassmann H, Wekerle H (1999) Transgenic Lewis rats overexpressing the proteolipid protein gene: myelin degeneration and its effect on T cell-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 97:595-606.
- Bradl M, Lassmann H (2010) Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:37-53.
- Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A (2001) Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* 27:117-120.
- Bruni JE (1998) Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech* 41:2-13.
- Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P, Herynek V, Jordan EK, Duncan ID, Frank JA (1999) Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:15256-15261.
- Cailloux F, Gauthier-Barichard F, Mimault C, Isabelle V, Courtois V, Giraud G, Dastugue B, Boespflug-Tanguy O (2000) Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease. *Eur J Hum Genet* 8:837-845.
- Calvino B, Grilo RM (2006) Central pain control. *Joint Bone Spine* 73:10-16.
- Campagnoni AT, Skoff RP (2001) The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes. *Brain Pathol* 11:74-91.
- Cao H, Zhang Y-Q (2008) Spinal glial activation contributes to pathological pain states. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 32:972-983.
- Carlsson M, Carlsson A (1990) Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 13:272-276.
- Charcot J (1877) Lectures on the diseases of the nervous system, delivered at La Salpêtrière.
- Cherubini E, Conti F (2001) Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci* 24:155-162.
- Chrousos GP (1998) Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci* 851:311-335.
- Chrousos GP, Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267:1244-1252.
- Chui HC, Zarow C, Mack WJ, Ellis WG, Zheng L, Jagust WJ, Mungas D, Reed BR, Kramer JH, Decarli CC, Weiner MW, Vinters HV (2006) Cognitive impact of subcortical vascular and Alzheimer's disease pathology. *Ann Neurol* 60:677-687.
- Cohen NJ, Squire LR (1980) Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science* 210:207-210.
- Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA (1999) The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol* 157:289-304.
- Commons KG, Connolly KR, Valentino RJ (2003) A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 28:206-215.
- Cope MB, Li X, Jumbo-Lucioni P, DiCostanzo CA, Jamison WG, Kesterson RA, Allison DB, Nagy TR (2009) Risperidone alters food intake, core body temperature, and locomotor activity in mice. *Physiology & Behavior* 96:457-463.
- Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
- Coutaux A, Adam F, Willer J-C, Le Bars D (2005) Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 72:359-371.
- Cratty MS, Birkle DL (1999) N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated corticotropin-releasing factor (CRF) release in cultured rat amygdala neurons. *Peptides* 20:93-100.

- Cremers FP, Pfeiffer RA, van de Pol TJ, Hofker MH, Kruse TA, Wieringa B, Ropers HH (1987) An interstitial duplication of the X chromosome in a male allows physical fine mapping of probes from the Xq13-q22 region. *Hum Genet* 77:23-27.
- Cryan JF, Holmes A (2005) The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 4:775-790.
- Csiza CK, de Lahunta A (1979) Myelin deficiency (md): a neurologic mutant in the Wistar rat. *Am J Pathol* 95:215-224.
- Cuddon PA, Lipsitz D, Duncan ID (1998) Myelin mosaicism and brain plasticity in heterozygous females of a canine X-linked trait. *Ann Neurol* 44:771-779.
- Davis M (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353-375.
- Davis M, Whalen PJ (2001) The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* 6:13-34.
- Debanne D, Campanac E, Bialowas A, Carlier E, Alcaraz G (2011) Axon physiology. *Physiol Rev* 91:555-602.
- Deiana S, Platt B, Riedel G (2011) The cholinergic system and spatial learning. *Behavioural Brain Research* 221:389-411.
- DeLeo JA, Yezierski RP (2001) The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain* 90:1-6.
- Delotterie D, Ruiz G, Brocard J, Schweitzer A, Roucard C, Roche Y, Suaud-Chagny M-F, Bressand K, Andrieux A (2010) Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology (Berl)* 208:131-141.
- Depiets B, Giraudet F, Avan P, Vaur-Barriere C, Bechon C, Gonthier-Gueret C, Boespflug-Tanguy O, Begou M (2012a) Motor but also cognitive defects in mice deleted for the major myelin protein.
- Depiets B, Giraudet F, Bechon C, Bardin L, Avan P, Boespflug-Tanguy O, Begou M (2012b) Lack of the major myelin protein causes central sensitization of thermal painful stimuli.
- Deschamps R, Moulignier A, Viret A (2011) *Mémoire et ses troubles*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris):17-035-B-20.
- Díaz RS, Monreal J, Lucas M (1990) Calcium movements mediated by proteolipid protein and nucleotides in liposomes prepared with the endogenous lipids from brain white matter. *J Neurochem* 55:1304-1309.
- Dickinson PJ, Fanarraga ML, Griffiths IR, Barrie JM, Kyriakides E, Montague P (1996) Oligodendrocyte progenitors in the embryonic spinal cord express DM-20. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22:188-198.
- Dumont Y, Fournier A, St-Pierre S, Quirion R (1995) Characterization of neuropeptide Y binding sites in rat brain membrane preparations using [125I][Leu31,Pro34]peptide YY and [125I]peptide YY3-36 as selective Y1 and Y2 radioligands. *J Pharmacol Exp Ther* 272:673-680.
- Dumont Y, St-Pierre JA, Quirion R (1996) Comparative autoradiographic distribution of neuropeptide Y Y1 receptors visualized with the Y1 receptor agonist [125I][Leu31,Pro34]PYY and the non-peptide antagonist [3H]BIBP3226. *Neuroreport* 7:901-904.
- Duncan ID, Hammang JP, Goda S, Quarles RH (1989) Myelination in the jimpy mouse in the absence of proteolipid protein. *Glia* 2:148-154.
- Duncan ID, Hammang JP, Jackson KF (1987a) Myelin mosaicism in female heterozygotes of the canine shaking pup and myelin-deficient rat mutants. *Brain Res* 402:168-172.
- Duncan ID, Hammang JP, Trapp BD (1987b) Abnormal compact myelin in the myelin-deficient rat: absence of proteolipid protein correlates with a defect in the intraperiod line. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6287-6291.
- Duncan ID, Jackson KF, Hammang JP, Marren D, Hoffman R (1993) Development of Myelin Mosaicism in the Optic Nerve of Heterozygotes of the X-Linked Myelin-Deficient (md) Rat Mutant. *Developmental Biology* 157:334-347.
- Duncan ID, Kondo Y, Zhang S-C (2011) The myelin mutants as models to study myelin repair in the leukodystrophies. *Neurotherapeutics* 8:607-624.
- Durant C, Christmas D, Nutt D (2010) The pharmacology of anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* 2:303-330.
- Echeverry S, Shi XQ, Zhang J (2008) Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *Pain* 135:37-47.

- Edgar JM, Anderson TJ, Dickinson PJ, Barrie JA, McCulloch MC, Nave K-A, Griffiths IR (2002a) Survival of, and competition between, oligodendrocytes expressing different alleles of the Plp gene. *J Cell Biol* 158:719-729.
- Edgar JM, Anderson TJ, Dickinson PJ, Barrie JA, McCulloch MC, Nave K-A, Griffiths IR (2002b) Survival of, and competition between, oligodendrocytes expressing different alleles of the Plp gene. *J Cell Biol* 158:719-729.
- Edgar JM, McCulloch MC, Montague P, Brown AM, Thilemann S, Pratola L, Gruenenfelder FI, Griffiths IR, Nave K-A (2010) Demyelination and axonal preservation in a transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *EMBO Mol Med* 2:42-50.
- Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang S-C, Fowler JH, Montague P, Barrie JA, McCulloch MC, Duncan ID, Garbern J, Nave KA, Griffiths IR (2004) Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 166:121-131.
- Eicher EM, Hoppe PC (1973) Use of chimeras to transmit lethal genes in the mouse and to demonstrate allelism of the two X-linked male lethal genes *jp* and *msd*. *J Exp Zool* 183:181-184.
- Emery B (2010) Regulation of Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *Science* 330:779 -782.
- Eroglu C, Barres BA (2010) Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468:223-231.
- Fanarraga ML, Griffiths IR, McCulloch MC, Barrie JA, Cattanaach BM, Brophy PJ, Kennedy PG (1991) Rumpshaker: an X-linked mutation affecting CNS myelination. A study of the female heterozygote. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17:323-334.
- Fanarraga ML, Griffiths IR, McCulloch MC, Barrie JA, Kennedy PG, Brophy PJ (1992) Rumpshaker: an X-linked mutation causing hypomyelination: developmental differences in myelination and glial cells between the optic nerve and spinal cord. *Glia* 5:161-170.
- Fancy SPJ, Chan JR, Baranzini SE, Franklin RJM, Rowitch DH (2011) Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu Rev Neurosci* 34:21-43.
- Fields RD (2008) White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci* 31:361-370.
- Filley CM (1998) The behavioral neurology of cerebral white matter. *Neurology* 50:1535-1540.
- Filley CM (2001) The behavioral neurology of white matter. Oxford University Press.
- Finn DA, Rutledge-Gorman MT, Crabbe JC (2003) Genetic animal models of anxiety. *Neurogenetics* 4:109-135.
- Folch J, Lees M (1951) Proteolipids, a new type of tissue lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 191:807-817.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119-130.
- Freund TF, Buzsáki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Frith C (1996) Neuropsychology of schizophrenia, what are the implications of intellectual and experiential abnormalities for the neurobiology of schizophrenia? *Br Med Bull* 52:618-626.
- Fulton D, Paez PM, Campagnoni AT (2010) The multiple roles of myelin protein genes during the development of the oligodendrocyte. *ASN Neuro* 2:e00027.
- Garbern JY et al. (1997) Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin. *Neuron* 19:205-218.
- Garbern JY, Cambi F, Lewis R, Shy M, Sima A, Kraft G, Vallat JM, Bosch EP, Hodes ME, Dlouhy S, Raskind W, Bird T, Macklin W, Kamholz J (1999) Peripheral neuropathy caused by proteolipid protein gene mutations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 883:351-365.
- Garbern JY, Hobson GM (1999) PLP1-Related Disorders. In Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephen K editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-1999 Jun 15 [updated 2010 Mar 16].
- Garbern JY, Yool DA, Moore GJ, Wilds IB, Faulk MW, Klugmann M, Nave K-A, Siermans EA, van der Knaap MS, Bird TD, Shy ME, Kamholz JA, Griffiths IR (2002) Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain* 125:551-561.
- Ge W-P, Yang X-J, Zhang Z, Wang H-K, Shen W, Deng Q-D, Duan S (2006) Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca²⁺-permeable AMPA receptors. *Science* 312:1533-1537.

- Gencic S, Abuelo D, Ambler M, Hudson LD (1989) Pelizaeus-Merzbacher disease: an X-linked neurologic disorder of myelin metabolism with a novel mutation in the gene encoding proteolipid protein. *Am J Hum Genet* 45:435-442.
- Gencic S, Hudson LD (1990) Conservative amino acid substitution in the myelin proteolipid protein of jimpymd mice. *J Neurosci* 10:117-124.
- Georgieva L et al. (2006) Convergent evidence that oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2) and interacting genes influence susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12469-12474.
- Ghandour MS, Feutz A-C, Jalabi W, Taleb O, Bessert D, Cypher M, Carlock L, Skoff RP (2002) Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signaling in immortalized jimpy oligodendrocytes. *Glia* 40:300-311.
- Ghashghaei HT, Hilgetag CC, Barbas H (2007) Sequence of information processing for emotions based on the anatomic dialogue between prefrontal cortex and amygdala. *Neuroimage* 34:905-923.
- Gisquet-Verrier (2006) Bases structurales et anatomiques de la mémoire. 18.
- Glavin GB (1985) Stress and brain noradrenaline: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 9:233-243.
- Gootjes L, Teipel SJ, Zebuhr Y, Schwarz R, Leinsinger G, Scheltens P, Möller H-J, Hampel H (2004) Regional distribution of white matter hyperintensities in vascular dementia, Alzheimer's disease and healthy aging. *Dement Geriatr Cogn Disord* 18:180-188.
- Gordon JA, Hen R (2004) Genetic approaches to the study of anxiety. *Annu Rev Neurosci* 27:193-222.
- Gow A, Gragerov A, Gard A, Colman DR, Lazzarini RA (1997) Conservation of topology, but not conformation, of the proteolipid proteins of the myelin sheath. *J Neurosci* 17:181-189.
- Gow A, Southwood CM, Lazzarini RA (1998) Disrupted proteolipid protein trafficking results in oligodendrocyte apoptosis in an animal model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol* 140:925-934.
- Graf P, Schacter DL (1985) Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn* 11:501-518.
- Gray J (1987) The neuropsychology of anxiety.
- Gray J, McNaughton N (2000) The neuropsychology of anxiety. An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system.
- Greer JM, Lees MB (2002) Myelin proteolipid protein--the first 50 years. *Int J Biochem Cell Biol* 34:211-215.
- Griebel G (1999) Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? *Pharmacol Ther* 82:1-61.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Thomson C, Vouyiouklis D, Nave KA (1998a) Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microsc Res Tech* 41:344-358.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA (1998b) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280:1610-1613.
- Griffiths IR, Duncan ID, McCulloch M, Harvey MJ (1981) Shaking pups: a disorder of central myelination in the Spaniel dog. Part 1. Clinical, genetic and light-microscopical observations. *J Neurol Sci* 50:423-433.
- Griffiths IR, Scott I, McCulloch MC, Barrie JA, McPhilemy K, Cattanach BM (1990) Rumpshaker mouse: a new X-linked mutation affecting myelination: evidence for a defect in PLP expression. *J Neurocytol* 19:273-283.
- Gudz TI, Komuro H, Macklin WB (2006) Glutamate stimulates oligodendrocyte progenitor migration mediated via an alpha v integrin/myelin proteolipid protein complex. *J Neurosci* 26:2458-2466.
- Gudz TI, Schneider TE, Haas TA, Macklin WB (2002) Myelin proteolipid protein forms a complex with integrins and may participate in integrin receptor signaling in oligodendrocytes. *J Neurosci* 22:7398-7407.
- Gulani V, Webb AG, Duncan ID, Lauterbur PC (2001) Apparent diffusion tensor measurements in myelin-deficient rat spinal cords. *Magn Reson Med* 45:191-195.
- Gunning-Dixon FM, Raz N (2000) The cognitive correlates of white matter abnormalities in normal aging: a quantitative review. *Neuropsychology* 14:224-232.
- Hains BC, Waxman SG (2006) Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* 26:4308-4317.

- Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL, Buxbaum JD, Haroutunian V, Fienberg AA (2001) Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4746-4751.
- Hardy J (2009) The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem* 110:1129-1134.
- Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Fera F, Smith WG, Weinberger DR (2002) Dextroamphetamine modulates the response of the human amygdala. *Neuropsychopharmacology* 27:1036-1040.
- Harrison PJ, Weinberger DR (2005) Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10:40-68; image 5.
- Harro J, Orelund L (2001) Depression as a spreading adjustment disorder of monoaminergic neurons: a case for primary implication of the locus coeruleus. *Brain Res Brain Res Rev* 38:79-128.
- Hassen WB, Bégou M, Traore A, Moussa AB, Boehm N, Ghandour MS, Renou J-P, Boespflug-Tanguy O, Bonny J-M (2009) Characterisation of spinal cord in a mouse model of spastic paraplegia related to abnormal axono-myelin interactions by in vivo quantitative MRI. *Neuroimage* 46:1-9.
- Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2002) Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 454:15-33.
- Hebb DO (1949) *The Organization of Behavior*. New-York: Wiley.
- Heimer L, de Olmos J, Alheid G, Pearson J, Sakamoto N, Shinoda K, Marksteiner J, Switzer R (1999) The human basal forebrain Part II. In Bloom FE, Bjorklund A, Hokfelt T (eds) *The primate nervous system. Part III. Handbook of chemical neuroanatomy* Amsterdam, p. pp 57-226.
- Herring NR, Konradi C (2011) Myelin, copper, and the cuprizone model of schizophrenia. *Front Biosci (Schol Ed)* 3:23-40.
- Hibbits N, Pannu R, Wu TJ, Armstrong RC (2009) Cuprizone demyelination of the corpus callosum in mice correlates with altered social interaction and impaired bilateral sensorimotor coordination. *ASN Neuro* 1.
- Hobson GM, Huang Z, Sperle K, Sistermans E, Rogan PK, Garbern JY, Kolodny E, Naidu S, Cambi F (2006) Splice-site contribution in alternative splicing of PLP1 and DM20: molecular studies in oligodendrocytes. *Hum Mutat* 27:69-77.
- Hobson GM, Huang Z, Sperle K, Stabley DL, Marks HG, Cambi F (2002) A PLP splicing abnormality is associated with an unusual presentation of PMD. *Ann Neurol* 52:477-488.
- Hodes ME, Blank CA, Pratt VM, Morales J, Napier J, Dlouhy SR (1997) Nonsense mutation in exon 3 of the proteolipid protein gene (PLP) in a family with an unusual form of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Med Genet* 69:121-125.
- Hodes ME, DeMyer WE, Pratt VM, Edwards MK, Dlouhy SR (1995) Girl with signs of Pelizaeus-Merzbacher disease heterozygous for a mutation in exon 2 of the proteolipid protein gene. *Am J Med Genet* 55:397-401.
- Hogan V, White K, Edgar J, McGill A, Karim S, McLaughlin M, Griffiths I, Turnbull D, Nichols P (2009) Increase in mitochondrial density within axons and supporting cells in response to demyelination in the Plp1 mouse model. *J Neurosci Res* 87:452-459.
- Hohoff C (2009) Anxiety in mice and men: a comparison. *J Neural Transm* 116:679-687.
- Hökfelt T, Broberger C, Diez M, Xu ZQ, Shi T, Kopp J, Zhang X, Holmberg K, Landry M, Koistinaho J (1999) Galanin and NPY, two peptides with multiple putative roles in the nervous system. *Horm Metab Res* 31:330-334.
- Holmes PV, Blanchard DC, Blanchard RJ, Brady LS, Crawley JN (1995) Chronic social stress increases levels of preprogalanin mRNA in the rat locus coeruleus. *Pharmacol Biochem Behav* 50:655-660.
- Homberg JR, van den Akker M, Raasø HS, Wardeh G, Binnekade R, Schoffelman ANM, de Vries TJ (2002) Enhanced motivation to self-administer cocaine is predicted by self-grooming behaviour and relates to dopamine release in the rat medial prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci* 15:1542-1550.
- Hosoido T, Motoyama S, Goto M, Mori F, Tajima T, Hirata H, Wada N (2009) Characteristics of H- and M-waves recorded from rat forelimbs. *Neurosci Lett* 450:239-241.

- Hoyaux D, Boom A, Van den Bosch L, Belot N, Martin J-J, Heizmann CW, Kiss R, Pochet R (2002) S100A6 overexpression within astrocytes associated with impaired axons from both ALS mouse model and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:736-744.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533-554.
- Hudson LD (2001) Oligodendrocytes. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Hudson LD, Berndt JA, Puckett C, Kozak CA, Lazzarini RA (1987) Aberrant splicing of proteolipid protein mRNA in the dysmyelinating jimpy mutant mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1454-1458.
- Hudson LD, Puckett C, Berndt J, Chan J, Gencic S (1989) Mutation of the proteolipid protein gene PLP in a human X chromosome-linked myelin disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8128-8131.
- Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, Carlton SM (2009) Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *Brain Res Rev* 60:202-213.
- Hüttemann M, Zhang Z, Mullins C, Bessert D, Lee I, Nave K-A, Appikarla S, Skoff RP (2009) Different proteolipid protein mutants exhibit unique metabolic defects. *ASN Neuro* 1.
- Hyde TM, Ziegler JC, Weinberger DR (1992) Psychiatric disturbances in metachromatic leukodystrophy. Insights into the neurobiology of psychosis. *Arch Neurol* 49:401-406.
- Iai M, Yamamura T, Takashima S (1997) Early expression of proteolipid protein in human fetal and infantile cerebri. *Pediatr Neurol* 17:235-239.
- Ida T, Miharu N, Hayashitani M, Shimokawa O, Harada N, Samura O, Kubota T, Niikawa N, Matsumoto N (2003) Functional disomy for Xq22-q23 in a girl with complex rearrangements of chromosomes 3 and X. *Am J Med Genet A* 120A:557-561.
- Ikenaka K, Kagawa T, Mikoshiba K (1992) Selective expression of DM-20, an alternatively spliced myelin proteolipid protein gene product, in developing nervous system and in nonglial cells. *J Neurochem* 58:2248-2253.
- Inoue K (2005) PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* 6:1-16.
- Inoue K, Tanaka H, Scaglia F, Araki A, Shaffer LG, Lupski JR (2001) Compensating for central nervous system dysmyelination: females with a proteolipid protein gene duplication and sustained clinical improvement. *Ann Neurol* 50:747-754.
- Inoue Y, Kagawa T, Matsumura Y, Ikenaka K, Mikoshiba K (1996) Cell death of oligodendrocytes or demyelination induced by overexpression of proteolipid protein depending on expressed gene dosage. *Neurosci Res* 25:161-172.
- Jahn O, Tenzer S, Werner HB (2009) Myelin Proteomics: Molecular Anatomy of an Insulating Sheath. *Mol Neurobiol* 40:55-72.
- Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N (2009) Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat* 3:5.
- Johnson RS, Roder JC, Riordan JR (1995) Over-expression of the DM-20 myelin proteolipid causes central nervous system demyelination in transgenic mice. *J Neurochem* 64:967-976.
- Johnston AW, McKusik VA (1962) A sex-linked recessive form of spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 14:83-94.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.
- Kagawa T, Ikenaka K, Inoue Y, Kuriyama S, Tsujii T, Nakao J, Nakajima K, Aruga J, Okano H, Mikoshiba K (1994a) Glial cell degeneration and hypomyelination caused by overexpression of myelin proteolipid protein gene. *Neuron* 13:427-442.
- Kagawa T, Nakao J, Yamada M, Shimizu K, Hayakawa T, Mikoshiba K, Ikenaka K (1994b) Fate of jimpy-type oligodendrocytes in jimpy heterozygote. *J Neurochem* 62:1887-1893.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.
- Kaplan MR, Meyer-Franke A, Lambert S, Bennett V, Duncan ID, Levinson SR, Barres BA (1997) Induction of sodium channel clustering by oligodendrocytes. *Nature* 386:724-728.

- Karim SA, Barrie JA, McCulloch MC, Montague P, Edgar JM, Iden DL, Anderson TJ, Nave K-A, Griffiths IR, McLaughlin M (2010) PLP/DM20 expression and turnover in a transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Glia* 58:1727-1738.
- Karim SA, Barrie JA, McCulloch MC, Montague P, Edgar JM, Kirkham D, Anderson TJ, Nave KA, Griffiths IR, McLaughlin M (2007) PLP overexpression perturbs myelin protein composition and myelination in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Glia* 55:341-351.
- Karoutzou G, Emrich HM, Dietrich DE (2008) The myelin-pathogenesis puzzle in schizophrenia: a literature review. *Mol Psychiatry* 13:245-260.
- Kennedy JL, Neves-Pereira M, King N, Lizak MV, Basile VS, Chartier MJ, Stein MB (2001) Dopamine system genes not linked to social phobia. *Psychiatr Genet* 11:213-217.
- Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Khan ZU, Muly EC (2011) Molecular mechanisms of working memory. *Behavioural Brain Research* 219:329-341.
- Kim MJ, Loucks RA, Palmer AL, Brown AC, Solomon KM, Marchante AN, Whalen PJ (2011) The structural and functional connectivity of the amygdala: From normal emotion to pathological anxiety. *Behavioural Brain Research* 223:403-410.
- Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach H-A, Murison R, Moser EI, Moser M-B (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10825-10830.
- Klinkenberg I, Sambeth A, Blokland A (2011) Acetylcholine and attention. *Behavioural Brain Research* 221:430-442.
- Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR, Nave KA (1997) Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18:59-70.
- Knapp PE (1996) Proteolipid protein: is it more than just a structural component of myelin? *Dev Neurosci* 18:297-308.
- Knapp PE, Skoff RP, Redstone DW (1986) Oligodendroglial cell death in jimpy mice: an explanation for the myelin deficit. *J Neurosci* 6:2813-2822.
- Krämer-Albers E-M, Gehrig-Burger K, Thiele C, Trotter J, Nave K-A (2006) Perturbed interactions of mutant proteolipid protein/DM20 with cholesterol and lipid rafts in oligodendroglia: implications for dysmyelination in spastic paraplegia. *J Neurosci* 26:11743-11752.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60:543-554.
- Krupp LB, Christodoulou C, Melville P, Scherl WF, MacAllister WS, Elkins LE (2004) Donepezil improved memory in multiple sclerosis in a randomized clinical trial. *Neurology* 63:1579-1585.
- Kuczynski B, Reed B, Mungas D, Weiner M, Chui HC, Jagust W (2008) Cognitive and anatomic contributions of metabolic decline in Alzheimer disease and cerebrovascular disease. *Arch Neurol* 65:650-655.
- Kujala P, Portin R, Ruutinen J (1997) The progress of cognitive decline in multiple sclerosis. A controlled 3-year follow-up. *Brain* 120 (Pt 2):289-297.
- Lachapelle F, Lapie P, Campagnoni AT, Gumpel M (1991) Oligodendrocytes of the jimpy phenotype can be partially restored by environmental factors in vivo. *J Neurosci Res* 29:235-243.
- Lai E, Teodoro T, Volchuk A (2007) Endoplasmic Reticulum Stress: Signaling the Unfolded Protein Response. *Physiology* 22:193-201.
- Laule C, Vavasour IM, Kolind SH, Li DKB, Traboulsee TL, Moore GRW, MacKay AL (2007) Magnetic resonance imaging of myelin. *Neurotherapeutics* 4:460-484.
- Lavallard-Rousseau M (2011) La mémoire In Vibert JF, Sébille A, Lavallard-Rousseau MC, Boureau F (eds). *Neurophysiologie: De la physiologie à l'exploration fonctionnelle Campus illustré*. Paris: Elsevier/Masson, p. 196-207.
- Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H (2010) When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci* 33:569-579.
- Learish RD, Brüstle O, Zhang SC, Duncan ID (1999) Intraventricular transplantation of oligodendrocyte progenitors into a fetal myelin mutant results in widespread formation of myelin. *Ann Neurol* 46:716-722.
- LeDoux J (1998) Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry* 44:1229-1238.

- Lee H, Iida T, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ (2005) Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* 25:1304-1310.
- Lee JA, Carvalho CMB, Lupski JR (2007) A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131:1235-1247.
- Lee JA, Inoue K, Cheung SW, Shaw CA, Stankiewicz P, Lupski JR (2006) Role of genomic architecture in PLP1 duplication causing Pelizaeus-Merzbacher disease. *Hum Mol Genet* 15:2250-2265.
- Leonardo ED, Hen R (2006) Genetics of affective and anxiety disorders. *Annu Rev Psychol* 57:117-137.
- de Leon-Casasola O (2011) New developments in the treatment algorithm for peripheral neuropathic pain. *Pain Med* 12 Suppl 3:S100-108.
- Leśniak W, Słomnicki ŁP, Filipek A (2009) S100A6 - new facts and features. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1087-1092.
- Leysen JE, Gommeren W, Eens A, de Chaffoy de Courcelles D, Stoof JC, Janssen PA (1988) Biochemical profile of risperidone, a new antipsychotic. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 247:661-670.
- Li S, Dobretsova A, Kokorina NA, Wight PA (2002) Repression of myelin proteolipid protein gene expression is mediated through both general and cell type-specific negative regulatory elements in nonexpressing cells. *J Neurochem* 82:159-171.
- Liu L, Rudin M, Kozlova EN (2000) Glial cell proliferation in the spinal cord after dorsal rhizotomy or sciatic nerve transection in the adult rat. *Exp Brain Res* 131:64-73.
- Lynch JL, Gallus NJ, Ericson ME, Beitz AJ (2008) Analysis of nociception, sex and peripheral nerve innervation in the TMEV animal model of multiple sclerosis. *Pain* 136:293-304.
- Magalon K, Zimmer C, Cayre M, Khaldi J, Bourbon C, Robles I, Tardif G, Viola A, Pruss RM, Bordet T, Durbec P (2012) Olesoxime accelerates myelination and promotes repair in models of demyelination. *Ann Neurol* 71:213-226.
- Mai J, Assheuer J, Paxinos G (1997) Atlas of the human brain Academic. New-York.
- Maizels M, McCarberg B (2005) Antidepressants and antiepileptic drugs for chronic non-cancer pain. *Am Fam Physician* 71:483-490.
- Mangin J-M, Gallo V (2011) The curious case of NG2 cells: transient trend or game changer? *ASN Neuro* 3:e00052.
- Manns J, Eichenbaum H (2007) Evolution of the hippocampus. In L. Krubitzer and J. Kaas (eds). *Evolution of Nervous Systems: The Evolution of Nervous Systems in Mammals* Oxford: Academic Press, p. 465-489.
- Manns J, Eichenbaum H (2008) Learning and memory: Brain systems In L.R. Squire, D. Berg, F. E. Bloom, S. du Lac, A. Ghosh, and N. C. Spitzer (eds). *Fundamental Neuroscience* San Diego: Academic Press, p. 1153-1178.
- Marble M, Voeller KS, May MM, Stevenson RE, Schwartz CE, Simensen RJ (2007) Pelizaeus Merzbacher syndrome: Neurocognitive function in a family with carrier manifestations. *American Journal of Medical Genetics Part A* 143A:1442-1447.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005) Role of the Immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6:521-532.
- Martin P (2006) Les nouvelles approches pharmacologiques du traitement de l'anxiété. vol. II.
- Mathew SJ, Price RB, Charney DS (2008) Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 148C:89-98.
- Mayer CA, Macklin WB, Avishai N, Balan K, Wilson CG, Miller MJ (2009) Mutation in the myelin proteolipid protein gene alters BK and SK channel function in the caudal medulla. *Respir Physiol Neurobiol* 169:303-314.
- Mayer JA, Larsen EC, Kondo Y, Duncan ID (2011) Characterization of a PLP-overexpressing transgenic rat, a model for the congenital form of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neurobiology of Disease* 44:231-238.
- McCullumsmith RE, Gupta D, Beneyto M, Kreger E, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH (2007) Expression of transcripts for myelination-related genes in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Schizophr Res* 90:15-27.

- McLaughlin M, Barrie JA, Karim S, Montague P, Edgar JM, Kirkham D, Thomson CE, Griffiths IR (2006) Processing of PLP in a model of Pelizaeus-Merzbacher disease/SPG2 due to the rumpshaker mutation. *Glia* 53:715-722.
- McLaughlin M, Hunter DJB, Thomson CE, Yool D, Kirkham D, Freer AA, Griffiths IR (2002) Evidence for possible interactions between PLP and DM20 within the myelin sheath. *Glia* 39:31-36.
- McLaughlin M, Karim SA, Montague P, Barrie JA, Kirkham D, Griffiths IR, Edgar JM (2007) Genetic background influences UPR but not PLP processing in the rumpshaker model of PMD/SPG2. *Neurochem Res* 32:167-176.
- McMahon SB, Malcangio M (2009) Current challenges in glia-pain biology. *Neuron* 64:46-54.
- Medana IM, Esiri MM (2003) Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain* 126:515-530.
- Meltzer HY, Huang M (2008) In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems In *Serotoninâ€ˆDopamine Interaction: Experimental Evidence and Therapeutic Relevance* Elsevier, p. 177-197.
- Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.
- Mesulam MM (1990) Large-scale neurocognitive networks and distributed processing for attention, language, and memory. *Ann Neurol* 28:597-613.
- Mesulam M-M (2000) Behavioral neuroanatomy. Large-scale neural networks, association cortex, frontal systems, the limbic system, and hemispheric specializations. In *Principles of Behavioral and Cognitive Neurology* New-York: Oxford University Press, USA, p. 1-120.
- Mignot C, Boespflug-Tanguy O, Gelot A, Dautigny A, Pham-Dinh D, Rodriguez D (2004) Alexander disease: putative mechanisms of an astrocytic encephalopathy. *Cell Mol Life Sci* 61:369-385.
- Millan MJ (2002) N-methyl-D-aspartate receptor-coupled glycineB receptors in the pathogenesis and treatment of schizophrenia: a critical review. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:191-213.
- Millan MJ (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology* 70:83-244.
- Miller MJ, Haxhiu MA, Georgiadis P, Gudz TI, Kangas CD, Macklin WB (2003) Proteolipid protein gene mutation induces altered ventilatory response to hypoxia in the myelin-deficient rat. *J Neurosci* 23:2265-2273.
- Miller MJ, Kangas CD, Macklin WB (2009) Neuronal expression of the proteolipid protein gene in the medulla of the mouse. *J Neurosci Res* 87:2842-2853.
- Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA (2005) Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry* 10:79-104.
- Mizuki Y, Suetsugi M, Ushijima I, Yamada M (1997) Differential effects of dopaminergic drugs on anxiety and arousal in healthy volunteers with high and low anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21:573-590.
- Le Moal M, Simon H (1991) Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 71:155-234.
- Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Research Reviews* 51:240-264.
- Mody I (2001) Distinguishing between GABA(A) receptors responsible for tonic and phasic conductances. *Neurochem Res* 26:907-913.
- Moghaddam B (2002) Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 51:775-787.
- Montag D, Giese KP, Bartsch U, Martini R, Lang Y, Blüthmann H, Karthigasan J, Kirschner DA, Wintergerst ES, Nave KA (1994) Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron* 13:229-246.
- Moulton JD (2007) Using morpholinos to control gene expression. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* Chapter 4:Unit 4.30.
- Mu Y, Gage FH (2011) Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6:85.

- Murray EA, Mishkin M (1998) Object recognition and location memory in monkeys with excitotoxic lesions of the amygdala and hippocampus. *J Neurosci* 18:6568-6582.
- Murray ME, Senjem ML, Petersen RC, Hollman JH, Preboske GM, Weigand SD, Knopman DS, Ferman TJ, Dickson DW, Jack CR Jr (2010) Functional impact of white matter hyperintensities in cognitively normal elderly subjects. *Arch Neurol* 67:1379-1385.
- Nadon NL, Arnheiter H, Hudson LD (1994) A combination of PLP and DM20 transgenes promotes partial myelination in the jimpy mouse. *J Neurochem* 63:822-833.
- Nadon NL, Duncan ID, Hudson LD (1990) A point mutation in the proteolipid protein gene of the « shaking pup » interrupts oligodendrocyte development. *Development* 110:529-537.
- Nakao J, Yamada M, Kagawa T, Kim SU, Miyao Y, Shimizu K, Mikoshiba K, Ikenaka K (1995) Expression of proteolipid protein gene is directly associated with secretion of a factor influencing oligodendrocyte development. *J Neurochem* 64:2396-2403.
- Nance MA, Boyadjiev S, Pratt VM, Taylor S, Hodes ME, Dlouhy SR (1996) Adult-onset neurodegenerative disorder due to proteolipid protein gene mutation in the mother of a man with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neurology* 47:1333-1335.
- Nave K-A (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468:244-252.
- Nave KA, Bloom FE, Milner RJ (1987) A single nucleotide difference in the gene for myelin proteolipid protein defines the jimpy mutation in mouse. *J Neurochem* 49:1873-1877.
- Nave K-A, Trapp BD (2008) Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* 31:535-561.
- Nezu A (1995) Neurophysiological study in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain Dev* 17:175-181.
- Novak V, Haertle M, Zhao P, Hu K, Munshi M, Novak P, Abduljalil A, Alsop D (2009) White matter hyperintensities and dynamics of postural control. *Magn Reson Imaging* 27:752-759.
- O'Tuathaigh CMP, Babovic D, O'Sullivan GJ, Clifford JJ, Tighe O, Croke DT, Harvey R, Waddington JL (2007) Phenotypic characterization of spatial cognition and social behavior in mice with « knockout » of the schizophrenia risk gene neuregulin 1. *Neuroscience* 147:18-27.
- Old EA, Malcangio M (2012) Chemokine mediated neuron-glia communication and aberrant signalling in neuropathic pain states. *Curr Opin Pharmacol* 12:67-73.
- Olechowski CJ, Truong JJ, Kerr BJ (2009) Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* 141:156-164.
- Oppenheimer SM, Gelb A, Girvin JP, Hachinski VC (1992) Cardiovascular effects of human insular cortex stimulation. *Neurology* 42:1727-1732.
- Osaka H, Kawanishi C, Inoue K, Uesugi H, Hiroshi K, Nishiyama K, Yamada Y, Suzuki K, Kimura S, Kosaka K (1995) Novel nonsense proteolipid protein gene mutation as a cause of X-linked spastic paraplegia in twin males. *Biochem Biophys Res Commun* 215:835-841.
- Osetowska E (1967) [New hereditary disease of the laboratory rabbit]. *Acta Neuropathol* 8:331-344.
- Otsuka M, Yoshioka K (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev* 73:229-308.
- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25:563-593.
- Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65-72.
- Paine TA, Jackman SL, Olmstead MC (2002) Cocaine-induced anxiety: alleviation by diazepam, but not buspirone, dimenhydrinate or diphenhydramine. *Behav Pharmacol* 13:511-523.
- Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA (2004) The hoffmann reflex: methodologic considerations and applications for use in sports medicine and athletic training research. *J Athl Train* 39:268-277.
- Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, Schnaar RL (2005) Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol* 195:208-217.
- Papez JW (1937) A Proposed Mechanism of Emotion. *Arch Neurol Psychiatry* 38:725-743.

- Parthey K, Kornhuber M, Kunze C, Wand D, Nolte KW, Nikolin S, Weis J, Schröder JM (2012) SOX10 mutation with peripheral amyelination and developmental disturbance of axons. *Muscle Nerve* 45:284-290.
- Patti F, Leone C, D'Amico E (2010) Treatment options of cognitive impairment in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 31:S265-269.
- Paty D, Ebers G (1999) Multiple sclerosis In *Multiple sclerosis* Philadelphia: F.A Davis Company, p. 135-191.
- Paxinos G, Mai JK (2003) *The Human Nervous System*, Second Edition 2^e éd. Academic Press.
- Pearsall GB, Nadon NL, Wolf MK, Billings-Gagliardi S (1997) Jimpy-4J mouse has a missense mutation in exon 2 of the Plp gene. *Dev Neurosci* 19:337-341.
- Penny S, Khaleeli Z, Cipolotti L, Thompson A, Ron M (2010) Early imaging predicts later cognitive impairment in primary progressive multiple sclerosis. *Neurology* 74:545-552.
- Pezze MA, Bast T, Feldon J (2003) Significance of dopamine transmission in the rat medial prefrontal cortex for conditioned fear. *Cereb Cortex* 13:371-380.
- Phan KL, Wager T, Taylor SF, Liberzon I (2002) Functional neuroanatomy of emotion: a meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. *Neuroimage* 16:331-348.
- Pitchot W, Ansseau M, Gonzalez Moreno A, Hansenne M, von Frenckell R (1992) Dopaminergic function in panic disorder: comparison with major and minor depression. *Biol Psychiatry* 32:1004-1011.
- Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 20:517-523.
- Plomin R, Owen MJ, McGuffin P (1994) The genetic basis of complex human behaviors. *Science* 264:1733-1739.
- Polgár E, Hughes DI, Arham AZ, Todd AJ (2005) Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci* 25:6658-6666.
- Pralong E, Magistretti P, Stoop R (2002) Cellular perspectives on the glutamate-monoamine interactions in limbic lobe structures and their relevance for some psychiatric disorders. *Prog Neurobiol* 67:173-202.
- Prins ND, van Dijk EJ, den Heijer T, Vermeer SE, Jolles J, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MMB (2005) Cerebral small-vessel disease and decline in information processing speed, executive function and memory. *Brain* 128:2034-2041.
- Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felšöci M (2011) Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res* 60:15-25.
- Quarles R, Macklin W, Morell P (1999) Part I: Cellular Neurochemistry And Neural Membranes, Chapter 4: Myelin Formation, Structure and Biochemistry, In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. , p. 51-71.
- Raskind WH, Williams CA, Hudson LD, Bird TD (1991) Complete deletion of the proteolipid protein gene (PLP) in a family with X-linked Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Hum Genet* 49:1355-1360.
- Readhead C, Schneider A, Griffiths I, Nave KA (1994) Premature arrest of myelin formation in transgenic mice with increased proteolipid protein gene dosage. *Neuron* 12:583-595.
- Regis S, Biancheri R, Bertini E, Burlina A, Lualdi S, Bianco MG, Devescovi R, Rossi A, Uziel G, Filocamo M (2008) Genotype-phenotype correlation in five Pelizaeus-Merzbacher disease patients with PLP1 gene duplications. *Clin Genet* 73:279-287.
- Richelson E (2010) New antipsychotic drugs: how do their receptor-binding profiles compare? *J Clin Psychiatry* 71:1243-1244.
- Roboti P, Swanton E, High S (2009) Differences in endoplasmic-reticulum quality control determine the cellular response to disease-associated mutants of proteolipid protein. *J Cell Sci* 122:3942-3953.
- Rosenberg SS, Powell BL, Chan JR (2007) Receiving mixed signals: uncoupling oligodendrocyte differentiation and myelination. *Cell Mol Life Sci* 64:3059-3068.
- Rosenbluth J, Nave K, Mierzwa A, Schiff R (2006) Subtle myelin defects in PLP null mice. *Glia* 54:172-182.
- Rosenbluth J, Schiff R, Lam P (2009) Effects of osmolality on PLP-null myelin structure: implications re axon damage. *Brain Res* 1253:191-197.

- Rossi DJ, Brady JD, Mohr C (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* 10:1377-1386.
- Roth BL (2000) Neuronal signal transduction pathways: wasteland or the promised land? *Sci STKE* 2000:pe1.
- Roy K, Murtie JC, El-Khodori BF, Edgar N, Sardi SP, Hooks BM, Benoit-Marand M, Chen C, Moore H, O'Donnell P, Brunner D, Corfas G (2007) Loss of erbB signaling in oligodendrocytes alters myelin and dopaminergic function, a potential mechanism for neuropsychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8131-8136.
- Roy-Byrne PP, Uhde TW, Sack DA, Linnoila M, Post RM (1986) Plasma HVA and anxiety in patients with panic disorder. *Biol Psychiatry* 21:849-853.
- Sakai K (2003) Reactivation of memory: role of medial temporal lobe and prefrontal cortex. *Rev Neurosci* 14:241-252.
- Sakry D, Karam K, Trotter J (2011) Synapses between NG2 glia and neurons. *J Anat* 219:2-7.
- Santarelli L, Gobbi G, Debs PC, Sibille ET, Blier P, Hen R, Heath MJ (2001) Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1912-1917.
- Sarret C, Combes P, Micheau P, Gelot A, Boespflug-Tanguy O, Vaur-Barrière C (2010) Novel neuronal proteolipid protein isoforms encoded by the human myelin proteolipid protein 1 gene. *Neuroscience* 166:522-538.
- Sato I, Onuma A, Goto N, Sakai F, Fujiwara I, Uematsu M, Osaka H, Okahashi S, Nonaka I, Tanaka S, Haginoya K (2011) A case with central and peripheral hypomyelination with hypogonadotropic hypogonadism and hypodontia (4H syndrome) plus cataract. *J Neurol Sci* 300:179-181.
- Saugier-Verber P, Munnich A, Bonneau D, Rozet JM, Le Merrer M, Gil R, Boespflug-Tanguy O (1994) X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat Genet* 6:257-262.
- Schiffmann R, Boespflug-Tanguy O (2001) An update on the leukodystrophies. *Curr Opin Neurol* 14:789-794.
- Schiffmann R, van der Knaap MS (2009) Invited article: an MRI-based approach to the diagnosis of white matter disorders. *Neurology* 72:750-759.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 20:11-21.
- Seron X, Jeannerod M, Baron J-C (1994) Neuropsychologie humaine. Liège: Mardaga.
- Shafi M, Zhou Y, Quintana J, Chow C, Fuster J, Bodner M (2007) Variability in neuronal activity in primate cortex during working memory tasks. *Neuroscience* 146:1082-1108.
- Shiffrin RM, Schneider W (1984) Automatic and controlled processing revisited. *Psychol Rev* 91:269-276.
- Shimamoto S, Takata M, Tokuda M, Oohira F, Tokumitsu H, Kobayashi R (2008) Interactions of S100A2 and S100A6 with the tetratricopeptide repeat proteins, Hsp90/Hsp70-organizing protein and kinesin light chain. *J Biol Chem* 283:28246-28258.
- Shy ME, Hobson G, Jain M, Boespflug Tanguy O, Garbern J, Sperle K, Li W, Gow A, Rodriguez D, Bertini E, Mancias P, Krajewski K, Lewis R, Kamholz J (2003) Schwann cell expression of PLP1 but not DM20 is necessary to prevent neuropathy. *Annals of Neurology* 53:354-365.
- Siddall PJ, Cousins MJ, Otte A, Griesing T, Chambers R, Murphy TK (2006) Pregabalin in central neuropathic pain associated with spinal cord injury: a placebo-controlled trial. *Neurology* 67:1792-1800.
- Sidman RL, Dickie MM, Appel SH (1964) Mutant mice (Quaking and Jimpy) with deficient myelination in the central nervous system. *Science* 144:309-311.
- Sima AAF, Pierson CR, Woltjer RL, Hobson GM, Golden JA, Kupsky WJ, Schauer GM, Bird TD, Skoff RP, Garbern JY (2009) Neuronal loss in Pelizaeus-Merzbacher disease differs in various mutations of the proteolipid protein 1. *Acta Neuropathologica* 118:531-539.
- Simons M, Trajkovic K (2006) Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* 119:4381-4389.
- Simons M, Trotter J (2007) Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol* 17:533-540.

- Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS (2005) Antidepressants in the Treatment of Neuropathic Pain. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 96:399-409.
- Skoff RP, Ghandour MS (1995) Oligodendrocytes in female carriers of the jimpy gene make more myelin than normal oligodendrocytes. *J Comp Neurol* 355:124-133.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.
- Solaro C, Uccelli MM (2011) Management of pain in multiple sclerosis: a pharmacological approach. *Nat Rev Neurol* 7:519-527.
- Song J, Goetz BD, Duncan ID (2006) His36Pro point-mutated proteolipid protein retained in the endoplasmic reticulum of oligodendrocytes in the shaking pup. *Glia* 53:257-265.
- Southwood C, Olson K, Wu C-Y, Gow A (2007) Novel alternatively spliced endoplasmic reticulum retention signal in the cytoplasmic loop of Proteolipid Protein-1. *J Neurosci Res* 85:471-478.
- Southwood CM, Garbern J, Jiang W, Gow A (2002) The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuron* 36:585-596.
- Spiechowicz M, Zylcz A, Bieganowski P, Kuznicki J, Filipek A (2007) Hsp70 is a new target of Sgt1—an interaction modulated by S100A6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357:1148-1153.
- Spörkel O, Uschkureit T, Büssow H, Stoffel W (2002) Oligodendrocytes expressing exclusively the DM20 isoform of the proteolipid protein gene: myelination and development. *Glia* 37:19-30.
- Stecca B, Southwood CM, Gragerov A, Kelley KA, Friedrich VL Jr, Gow A (2000) The evolution of lipophilin genes from invertebrates to tetrapods: DM-20 cannot replace proteolipid protein in CNS myelin. *J Neurosci* 20:4002-4010.
- Stein DJ, Westenberg HGM, Liebowitz MR (2002) Social anxiety disorder and generalized anxiety disorder: serotonergic and dopaminergic neurocircuitry. *J Clin Psychiatry* 63 Suppl 6:12-19.
- Stein JL, Wiedholz LM, Bassett DS, Weinberger DR, Zink CF, Mattay VS, Meyer-Lindenberg A (2007) A validated network of effective amygdala connectivity. *Neuroimage* 36:736-745.
- Stewart SE, Platko J, Fagerness J, Birns J, Jenike E, Smoller JW, Perlis R, Leboyer M, Delorme R, Chabane N, Rauch SL, Jenike MA, Pauls DL (2007) A genetic family-based association study of OLIG2 in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 64:209-214.
- Sunyach C, Michaud M, Arnoux T, Bernard-Marissal N, Aebischer J, Latyszenok V, Gouarné C, Raoul C, Pruss RM, Bordet T, Pettmann B (2012) Olesoxime delays muscle denervation, astrogliosis, microglial activation and motoneuron death in an ALS mouse model. *Neuropharmacology* 62:2345-2352.
- Svenstrup K, Giraud G, Boespflug-Tanguy O, Danielsen ER, Thomsen C, Rasmussen K, Law I, Vogel A, Stokholm J, Crone C, Hjerlind LE, Nielsen JE (2010) Hereditary spastic paraplegia caused by the PLP1 « rumpshaker mutation ». *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 81:666-672.
- Swanson L (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin* 9:321-353.
- Swanton E, Holland A, High S, Woodman P (2005) Disease-associated mutations cause premature oligomerization of myelin proteolipid protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:4342-4347.
- Sweerts BW, Jarrott B, Lawrence AJ (1999) Expression of preprogalanin mRNA following acute and chronic restraint stress in brains of normotensive and hypertensive rats. *Brain Res Mol Brain Res* 69:113-123.
- Tanaka H, Ma J, Tanaka KF, Takao K, Komada M, Tanda K, Suzuki A, Ishibashi T, Baba H, Isa T, Shigemoto R, Ono K, Miyakawa T, Ikenaka K (2009) Mice with altered myelin proteolipid protein gene expression display cognitive deficits accompanied by abnormal neuron-glia interactions and decreased conduction velocities. *J Neurosci* 29:8363-8371.
- Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H (2000) Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol* 405:397-406.
- Taraszkowska A, Zelman IB (1987) Electron-microscopic study of glia in pt rabbit during myelination. *Neuropatol Pol* 25:351-368.
- Thaxton C, Bhat MA (2009) Myelination and Regional Domain Differentiation of the Axon E. Koenig, éd. *Cell Biology of the Axon* 48:1-28.

- Thibault K, Calvino B, Pezet S (2011) Characterisation of sensory abnormalities observed in an animal model of multiple sclerosis: a behavioural and pharmacological study. *Eur J Pain* 15:231.e1-16.
- Thiel CM, Schwarting RK (2001) Dopaminergic lateralisation in the forebrain: relations to behavioural asymmetries and anxiety in male Wistar rats. *Neuropsychobiology* 43:192-199.
- Thomas EA (2006) Molecular profiling of antipsychotic drug function: convergent mechanisms in the pathology and treatment of psychiatric disorders. *Mol Neurobiol* 34:109-128.
- Thomson CE, Anderson TJ, McCulloch MC, Dickinson P, Vouyiouklis DA, Griffiths IR (1999) The early phenotype associated with the jimpy mutation of the proteolipid protein gene. *J Neurocytol* 28:207-221.
- Thomson CE, Montague P, Jung M, Nave KA, Griffiths IR (1997) Phenotypic severity of murine Plp mutants reflects in vivo and in vitro variations in transport of PLP isoproteins. *Glia* 20:322-332.
- Tiihonen J, Kuikka J, Bergström K, Lepola U, Koponen H, Leinonen E (1997) Dopamine reuptake site densities in patients with social phobia. *Am J Psychiatry* 154:239-242.
- Timsit SG, Bally-Cuif L, Colman DR, Zalc B (1992) DM-20 mRNA is expressed during the embryonic development of the nervous system of the mouse. *J Neurochem* 58:1172-1175.
- Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, Jones PB, Starkey M, Webster MJ, Yolken RH, Bahn S (2003) Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet* 362:798-805.
- Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823-836.
- Tosic M, Dolivo M, Domańska-Janik K, Matthieu JM (1994) Paralytic tremor (pt): a new allele of the proteolipid protein gene in rabbits. *J Neurochem* 63:2210-2216.
- Tosic M, Matthey B, Gow A, Lazzarini RA, Matthieu JM (1997) Intracellular transport of the DM-20 bearing shaking pup (shp) mutation and its possible phenotypic consequences. *J Neurosci Res* 50:844-852.
- Tóth K, Freund TF (1992) Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: Their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience* 49:793-805.
- Trotter J, Karram K, Nishiyama A (2010) NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev* 63:72-82.
- Tsuda A, Tanaka M (1985) Differential changes in noradrenaline turnover in specific regions of rat brain produced by controllable and uncontrollable shocks. *Behav Neurosci* 99:802-817.
- Tsuda M, Inoue K, Salter MW (2005) Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in [']small' glia. *Trends in Neurosciences* 28:101-107.
- Tullberg M, Fletcher E, DeCarli C, Mungas D, Reed BR, Harvey DJ, Weiner MW, Chui HC, Jagust WJ (2004) White matter lesions impair frontal lobe function regardless of their location. *Neurology* 63:246-253.
- Uranova N, Orlovskaya D, Vikhreva O, Zimina I, Kolomeets N, Vostrikov V, Rachmanova V (2001) Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res Bull* 55:597-610.
- Vázquez-López M, Ruiz-Martín Y, de Castro-Castro P, Garzo-Fernández C, Martín-del Valle F, Márquez-de la Plata L (2008) [Central hypomyelination, hypogonadotrophic hypogonadism and hypodontia: a new leukodystrophy]. *Rev Neurol* 47:204-208.
- Vela JM, González B, Castellano B (1998) Understanding glial abnormalities associated with myelin deficiency in the jimpy mutant mouse. *Brain Research Reviews* 26:29-42.
- Verheij JBG, Sival DA, van der Hoeven JH, Vos YJ, Meiners LC, Brouwer OF, van Essen AJ (2006) Shah-Waardenburg syndrome and PCWH associated with SOX10 mutations: a case report and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol* 10:11-17.
- Vermeesch MK, Knapp PE, Skoff RP, Studzinski DM, Benjamins JA (1990) Death of individual oligodendrocytes in jimpy brain precedes expression of proteolipid protein. *Dev Neurosci* 12:303-315.
- Vostrikov V, Orlovskaya D, Uranova N (2008) Deficit of pericapillary oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry* 9:34-42.
- Vostrikov VM, Uranova NA, Orlovskaya DD (2007) Deficit of perineuronal oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders. *Schizophr Res* 94:273-280.
- Wang E, Dimova N, Sperle K, Huang Z, Lock L, McCulloch MC, Edgar JM, Hobson GM, Cambi F (2008) Deletion of a splicing enhancer disrupts PLP1/DM20 ratio and myelin stability. *Exp Neurol* 214:322-330.
- Watkins LR, Maier SF (2002) Beyond Neurons: Evidence That Immune and Glial Cells Contribute to Pathological Pain States. *Physiological Reviews* 82:981 -1011.

- Watkins LR, Milligan ED, Maier SF (2003) Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv Exp Med Biol* 521:1-21.
- Weiss MD, Hammer J, Quarles RH (2000) Oligodendrocytes in aging mice lacking myelin-associated glycoprotein are dystrophic but not apoptotic. *J Neurosci Res* 62:772-780.
- Werner HB, Jahn O (2010) Myelin matters: proteomic insights into white matter disorders. *Expert Rev Proteomics* 7:159-164.
- Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG, Möbius W, Guarente L, Casaccia-Bonnel P, Jahn O, Nave K-A (2007) Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci* 27:7717-7730.
- Wheeler ME, Buckner RL (2004) Functional-anatomic correlates of remembering and knowing. *Neuroimage* 21:1337-1349.
- Wight PA, Dobretsova A (2004) Where, when and how much: regulation of myelin proteolipid protein gene expression. *Cell Mol Life Sci* 61:810-821.
- Willard HF, Riordan JR (1985) Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: implications for X-linked myelin disorders. *Science* 230:940-942.
- Willick ML, Kokkinidis L (1995) Cocaine enhances the expression of fear-potentiated startle: evaluation of state-dependent extinction and the shock-sensitization of acoustic startle. *Behav Neurosci* 109:929-938.
- Wodarski R, Clark AK, Grist J, Marchand F, Malcangio M (2009) Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pain* 13:807-811.
- Wojcikiewicz RJH (2012) Inositol 1,4,5 trisphosphate receptor degradation pathways. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling* 1:126-135.
- Wolf NI, Sistermans EA, Cundall M, Hobson GM, Davis-Williams AP, Palmer R, Stubbs P, Davies S, Endziniene M, Wu Y, Chong WK, Malcolm S, Surtees R, Garbern JY, Woodward KJ (2005) Three or more copies of the proteolipid protein gene PLP1 cause severe Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain* 128:743-751.
- Xiao WH, Zheng FY, Bennett GJ, Bordet T, Pruss RM (2009) Olesoxime (cholest-4-en-3-one, oxime): analgesic and neuroprotective effects in a rat model of painful peripheral neuropathy produced by the chemotherapeutic agent, paclitaxel. *Pain* 147:202-209.
- Xu H, Yang H-J, McConomy B, Browning R, Li X-M (2010) Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mouse exposed to cuprizone: effects of antipsychotics. *Front Behav Neurosci* 4:8.
- Xu H, Yang H-J, Zhang Y, Clough R, Browning R, Li X-M (2009) Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mice exposed to cuprizone. *Behav Neurosci* 123:418-429.
- Yamada M, Ivanova A, Yamaguchi Y, Lees MB, Ikenaka K (1999) Proteolipid protein gene product can be secreted and exhibit biological activity during early development. *J Neurosci* 19:2143-2151.
- Yamada M, Jung M, Tetsushi K, Ivanova A, Nave KA, Ikenaka K (2001) Mutant Plp/DM20 cannot be processed to secrete PLP-related oligodendrocyte differentiation/survival factor. *Neurochem Res* 26:639-645.
- Yates C, Charlesworth A, Allen SR, Reese NB, Skinner RD, Garcia-Rill E (2008) The onset of hyperreflexia in the rat following complete spinal cord transection. *Spinal Cord* 46:798-803.
- Yin X, Baek RC, Kirschner DA, Peterson A, Fujii Y, Nave K-A, Macklin WB, Trapp BD (2006) Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin. *J Cell Biol* 172:469-478.
- Yiu EM, Farrell SA, Soman T (2009) Classic Pelizaeus Merzbacher disease in a girl with an unbalanced chromosomal translocation and functional duplication of PLP1. *Movement Disorders* 24:2171-2172.
- Yool DA, Klugmann M, McLaughlin M, Vouyiouklis DA, Dimou L, Barrie JA, McCulloch MC, Nave KA, Griffiths IR (2001) Myelin proteolipid proteins promote the interaction of oligodendrocytes and axons. *J Neurosci Res* 63:151-164.
- Zarzhovsky N (2010) White matter lesions augment cognitive impairments of dopaminergic denervation of the caudate nucleus in Parkinson disease [abstract OP294]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37 (Suppl 2), S249.
- Zhang Y, Xu H, Jiang W, Xiao L, Yan B, He J, Wang Y, Bi X, Li X, Kong J, Li X-M (2008a) Quetiapine alleviates the cuprizone-induced white matter pathology in the brain of C57BL/6 mouse. *Schizophr Res* 106:182-191.

- Zhang Z, Zhang Z-Y, Fauser U, Schluesener HJ (2008b) Mechanical allodynia and spinal up-regulation of P2X4 receptor in experimental autoimmune neuritis rats. *Neuroscience* 152:495-501.
- Zhuo M, Wu G, Wu L-J (2011) Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Mol Brain* 4:31.
- Zielasek J, Toyka KV (1999) Nerve conduction abnormalities and neuromyotonia in genetically engineered mouse models of human hereditary neuropathies. *Ann N Y Acad Sci* 883:310-320.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1. Liste des gènes présents sur les plaques pré-façonées SABiosciences

"Neurogénèse"			"Neurotrophines et récepteurs"			"Récepteurs de neurotransmetteurs et régulateurs"		
Genes	Nom	Genes	Nom	Genes	Nom			
Ache	acetylcholinesterase	Adcyap1r1	Adenylylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1	Ache	Acetylcholinesterase			
Adora1	adenosine A1 receptor	Artn	Artemin	Anxa9	Annexin A9			
Adora2a	adenosine A2a receptor	Bax	Bcl2-associated X protein	Brs3	Bombesin-like receptor 3			
Alk	anaplastic lymphoma kinase	Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	Cckar	Cholecystokinin A receptor			
Apbb1	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1	Bdnf	Brain derived neurotrophic factor	Cckbr	Cholecystokinin B receptor			
Apoe	apolipoprotein E	Cbln1	Cerebellin 1 precursor protein	Chat	Choline acetyltransferase			
Arnt2	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	Cckar	Cholecystokinin A receptor	Chrm1	Cholinergic receptor, muscarinic 1, CNS			
Artn	artemin	Cnfr	Ciliary neurotrophic factor receptor	Chrm2	Cholinergic receptor, muscarinic 2, cardiac			
Ascl1	achaete-scute complex homolog 1 (Drosophila)	Crh	Coricotropin releasing hormone	Chrm3	Cholinergic receptor, muscarinic 3, cardiac			
Bai1	brain-specific angiogenesis inhibitor 1	Crtbp	Coricotropin releasing hormone binding protein	Chrm4	Cholinergic receptor, muscarinic 4			
Bdnf	brain derived neurotrophic factor	Chr1	Coricotropin releasing hormone receptor 1	Chrm5	Cholinergic receptor, muscarinic 5			
Bmp15	bone morphogenetic protein 15	Chrm2	Coricotropin releasing hormone receptor 2	Chrna1	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle)			
Bmp2	bone morphogenetic protein 2	Cx3cr1	Chemokine (C-X3-C) receptor 1	Chrna2	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2 (neuronal)			
Bmp4	bone morphogenetic protein 4	Cxcr4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Chrna3	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3			
Bmp8b	bone morphogenetic protein 8b	Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	Chrna4	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4			
Cdk5r1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	Fgf2	Fibroblast growth factor 2	Chrna5	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 5			
Cdk5rap1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1	Fgf9	Fibroblast growth factor 9	Chrna6	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 6			
Cdk5rap2	CDK5 regulatory subunit associated protein 2	Fgf11	Fibroblast growth factor receptor 1	Chrna7	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7			
Cdk5rap3	CDK5 regulatory subunit associated protein 2	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	Chrnbl	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle)			
Chrm2	cholinergic receptor, muscarinic 2	Frs2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2	Chrnbl	Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 1 (neuronal)			
Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Frs3	Fibroblast growth factor receptor substrate 3	Chrnbl	Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal)			
Dlg4	discs, large homolog 4 (Drosophila)	Fus	Fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human)	Chrnbl	Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 3			
Dll1	delta-like 1 (Drosophila)	Gat1	Galanin receptor 1	Chrnbl	Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 4			
Drd2	dopamine receptor D2	Gat2	Galanin receptor 2	Chrne	Cholinergic receptor, nicotinic, delta polypeptide			
Drd5	dopamine receptor D5	Gdnf	Glial cell line derived neurotrophic factor	Chrng	Cholinergic receptor, nicotinic, epsilon polypeptide			
Dvl3	dishevelled 3, dsh homolog (Drosophila)	Gfra1	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1	Comt1	Catechol-O-methyltransferase 1			
Enb1	ephrin B1	Gfra2	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2	Drd1a	Dopamine receptor D1A			
Egf	epidermal growth factor	Gfra3	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 3	Drd2	Dopamine receptor 2			
Ep300	E1A binding protein p300	Gnfb	Glia maturation factor, beta	Drd3	Dopamine receptor 3			
Erb2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuroglioblastoma derived oncogene homolog (avian)	Gnfg	Glia maturation factor, gamma	Drd4	Dopamine receptor 4			
Fez1	Fasciculation and elongation protein zeta 1 (zyglin I)	Npfr2	Neuropeptide FF receptor 2	Drd5	Dopamine receptor 5			
Fgf13	Fibroblast growth factor 13	Gpr	Gastrin releasing peptide receptor	Gabra1	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 1			
Fgf2	Fibroblast growth factor 2	Hcrt	Hypocretin	Gabra2	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 2			
Flna	Filamin, alpha	Hcrt1	Hypocretin (orexin) receptor 1	Gabra3	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 3			
Gdnf	Glial cell line derived neurotrophic factor	Hcrt2	Hypocretin (orexin) receptor 2	Gabra4	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 4			
Gnao1	Guanine nucleotide binding protein, alpha o	Hspb1	Heat shock protein 1	Gabra5	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 5			
Gpi1	Glucose phosphate isomerase 1	Il10	Interleukin 10	Gabra6	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 6			
Gri1	Glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1)	Il10ra	Interleukin 10 receptor, alpha	Gabr2	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 2			
Hdac4	Histone deacetylase 4	Il1b	Interleukin 1 beta	Gabrb3	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 3			
Hdac7	Histone deacetylase 7	Il1r1	Interleukin 1 receptor, type I	Gabrd	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit delta			
Hes1	Hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	Il6	Interleukin 6	Gabrg1	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit gamma 1			
Hey1	Hairy enhancer-of-split related with YRPW motif 1	Il6ra	Interleukin 6 receptor, alpha	Gabrg2	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit gamma 2			
Hey2	Hairy enhancer-of-split related with YRPW motif 2	Il6st	Interleukin 6 signal transducer	Gabrp	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi			
Heyl	Hairy enhancer-of-split related with YRPW motif-like	Lif	Leukemia inhibitory factor	Gabrq	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit theta			
Il3	Interleukin 3	Lifr	Leukemia inhibitory factor receptor	Gabrr1	Gamma-aminobutyric acid (GABA) C receptor, subunit rho 1			
Inhba	Inhibin beta-A	Maged1	Melanoma antigen, family D, 1	Gabrr2	Gamma-aminobutyric acid (GABA) C receptor, subunit rho 2			
Mdk	Mitkine	Mc2r	Melanocortin 2 receptor	Gad1	Glutamic acid decarboxylase 1			

Annexe 1 (suite). Liste des gènes présents sur les plaques pré-façonées SABiosciences

"Neurogénèse"		"Neurotrophines et récepteurs"		"Récepteurs de neurotransmetteurs et régulateurs"	
Genes	Nom	Genes	Nom	Genes	Nom
Mezf2c	Myocyte enhancer factor 2C	Mezf2c	Myocyte enhancer factor 2C	Gair1	Galanin receptor 1
Mit1	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1	Mit3	Metallothionein 3	Gair2	Galanin receptor 2
Ncoa6	Nuclear receptor coactivator 6	Myc	Myelocytomatosis oncogene	Gair3	Galanin receptor 3
Ndn	Necdin	Nf1	Neurofibromatosis 1	Gira1	Glycine receptor, alpha 1 subunit
Ndp	Norrie disease (pseudoglioma) (human)	Ngf	Nerve growth factor	Gira2	Glycine receptor, alpha 2 subunit
Neurod1	Neurogenic differentiation 1	Ngr1	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	Gira3	Glycine receptor, alpha 3 subunit
Nog	Noggin	Ngfrap1	Nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	Gira4	Glycine receptor, alpha 4 subunit
Notch2	Notch gene homolog 2 (Drosophila)	Nmbr	Neuromedin B receptor	Girb	Glycine receptor, beta subunit
Nptx1	Neuronal pentraxin 1	Npff	Neuropeptide FF-amide peptide precursor	Qrfpr	Pyroglutamylated RFamide peptide receptor
Nrcam	Neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule	Npy	Neuropeptide Y	Npy1r	Neuropeptide Y receptor 1
Nrg1	Neuregulin 1	Npy1r	Neuropeptide Y receptor Y1	Prokr1	Prokineticin receptor 1
Nrp1	Neuropilin 1	Npy2r	Neuropeptide Y receptor Y2	Prokr2	Prokineticin receptor 2
Nrp2	Neuropilin 2	Nr1h2	Nuclear receptor subfamily 1, group 1, member 2	Npyfr2	Neuropeptide FF receptor 2
Ntn1	Nefrin 1	Nrg1	Neuregulin 1	Gpr83	G protein-coupled receptor 83
Odz1	Odd Ozfren-m homolog 1 (Drosophila)	Nrg4	Neuregulin 4	Grpr	Gastrin releasing peptide receptor
Pafah1b1	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, subunit 1	Ntf3	Neurotrophin 3	Htr3a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A
Pard3	Pax-3 (partitioning defective 3) homolog (C. elegans)	Ntf5	Neurotrophin 5	Maoa	Monoamine oxidase A
Pard6b	Par-6 (partitioning defective 6) homolog beta (C. elegans)	Ntrk1	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1	Mc2r	Melanocortin 2 receptor
Pax3	Paired box gene 3	Ntrk2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	Nmur1	Neuromedin U receptor 1
Pax5	Paired box gene 5	Ntrk1	Neuroligin receptor 1	Nmur2	Neuromedin U receptor 2
Pax6	Paired box gene 6	Npy1r	Pancreatic polypeptide receptor 1	Npy1r	Neuropeptide Y receptor Y1
Pou3f3	POU domain, class 3, transcription factor 3	Pspn	Persephin	Npy2r	Neuropeptide Y receptor Y2
Pou4f1	POU domain, class 4, transcription factor 1	Ptger2	Prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2)	Npy5r	Neuropeptide Y receptor Y5
Ptin	Pleiotrophin	Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	Npy6r	Neuropeptide Y receptor Y6
Rac1	RAS-related C3 botulinum substrate 1	Stat2	Signal transducer and activator of transcription 2	Ntrk1	Neurotensin receptor 1
Robo1	Roundabout homolog 1 (Drosophila)	Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3	Pgr15l	G protein-coupled receptor 15-like
Rtn4	Reliculin 4	Stat4	Signal transducer and activator of transcription 4	Ppyr1	Pancreatic polypeptide receptor 1
S100a6	S100 calcium binding protein A6 (calycalin)	Tf1g	Trk-fused gene	Prlhr	Prolactin releasing hormone receptor
S100b	S100 protein, beta polypeptide, neural	Tgfa	Transforming growth factor alpha	Sic5a7	Solute carrier family 5 (choline transporter), member 7
Sema4d	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	Sstr1	Somatostatin receptor 1
Shh	Sonic hedgehog	Tgfb11	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	Sstr2	Somatostatin receptor 2
Slt2	Slt homolog 2 (Drosophila)	Cd40	CD40 antigen	Sstr3	Somatostatin receptor 3
Sox3	SRY-box containing gene 3	Tro	Trophinin	Sstr4	Somatostatin receptor 4
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3	Trp53	Transformation related protein 53	Sstr5	Somatostatin receptor 5
Tnr	Tenascin R	Ucn	Urocortin	Tacr1	Tachykinin receptor 1
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	Zfp110	Zinc finger protein 110	Tacr2	Tachykinin receptor 2
Ywhah	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	Zfp91	Zinc finger protein 91	Tacr3	Tachykinin receptor 3
Gusb	Glucuronidase, beta	Gusb	Glucuronidase, beta	Gusb	Glucuronidase, beta
Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Actb	Actin, beta	Actb	Actin, beta	Actb	Actin, beta

ETUDE PHYSIOPATHOLOGIQUE DE MODELES MURINS DE LEUCODYSTROPHIES DYSMYELINISANTES ET APPROCHE THERAPEUTIQUE

Résumé

Les mutations du gène des protéolipoprotéines, *PLP1*, codant des protéines structurales majeures de la myéline du système nerveux central : PLP et DM20, sont responsables d'un sous-groupe de leucodystrophies dysmyélinisantes liées à l'X. La forme la plus sévère, la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD), induite principalement par des duplications du gène conduit à une hypomyélinisation majeure ; tandis que la forme la plus modérée, la paraplégie spastique de type 2 (SPG2), induite par des mutations non-sens ou des délétions du gène conduit à une myéline mal compactée et une dégénérescence axonale tardive. Ce travail de thèse porte sur la caractérisation phénotypique de souris transgéniques mâles présentant une invalidation du gène *Plp1* (souris Plp null), ainsi que des femelles hétérozygotes pour cette mutation et surexprimant le gène *Plp 1* (souris PLOA), modèles des mères transmettrices de ces maladies. Une étude longitudinale du comportement de ces souris a été réalisée et a permis de mettre en évidence chez les souris mâles Plp null l'apparition de troubles moteurs, sensitifs et cognitifs, qui ont pu ensuite être reliés à des anomalies d'expression (1) de marqueurs astrocytaires ou microgliaux et de neuropeptides impliqués dans la douleur au niveau de la moelle épinière, (2) de marqueurs ayant un rôle dans les processus cognitifs dans le cerveau et notamment dans certaines régions de l'hippocampe et (3) à des altérations des vitesses de conduction nerveuse. Chez les femelles mutées *Plp1*, les anomalies comportementales semblent liées au génotype, avec le développement de symptômes uniquement chez les mères porteuses de mutation modérée.

Depuis quelques années, un ensemble de données évoquent un rôle de la substance blanche, et notamment la myéline, dans les fonctions comportementales et cognitives. Les résultats obtenus au cours de ce travail confirment l'intérêt des souris Plp null pour mieux comprendre ce rôle. De plus, les nombreuses similarités identifiées entre les modèles animaux et la pathologie humaine permettent d'envisager l'utilisation de ces modèles pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous avons ainsi évalué l'efficacité d'un neuroleptique atypique sur les troubles comportementaux des souris mâles Plp null.

Mots-clés : *PLP1*, protéolipoprotéines, leucodystrophies dysmyélinisantes, maladie de Pelizaeus-Merzbacher, paraplégie spastique de type 2, modèles animaux, comportement, étude physiopathologique.